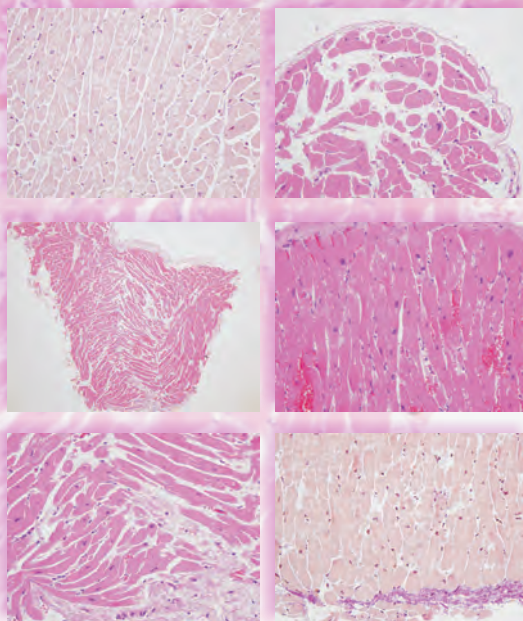


**Die Reduktion der Kontraktionsamplitude elektrisch  
stimulierter, isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten  
der Ratte durch den  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonisten  
U-50,488 wird nicht über eine Adenylylcyclase vermittelt**

**Birgit Dierkes**



**INAUGURALDISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

**Die Reduktion der Kontraktionsamplitude elektrisch stimulierter,  
isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten der Ratte durch den  
 $\kappa$ -Opioidrezeptoragonisten U-50,488 wird nicht über eine  
Adenylylcyclase vermittelt**

**INAUGURALDISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Birgit Dierkes, geb. Kube**  
aus Erfurt

Gießen 2009

Aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gf. Direktor: Prof. Dr. M. Kracht

Gutachter: Prof. Dr. F. Dreyer

Gutachter: Prof. Dr. G. Nöll

Tag der Disputation: 28.04.2010

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Opioide	1
1.2	Opioidrezeptoren	2
1.3	Signaltransduktion	3
1.4	Die Funktion des endogenen Opioidsystem	6
1.5	Aufgabenstellung	7
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>9</b>
2.1	Lösungen	9
2.2	Gewinnung der Kardiomyozyten	11
2.3	Membranpräparation	12
2.4	Proteinbestimmung	12
2.5	Adenylylcyclase-Assay	13
2.6	Visuelle Kontraktilitätsmessung	16
2.7	Statistische Auswertung der Daten	17
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>18</b>
3.1	cAMP-Bildung durch die Adenylylcyclase in zuvor gefrorenen Membranpräparationen aus ventrikulären Kardiomyozyten	18
3.1.1	Zeitabhängige Wirkung von Isoprenalin (10 $\mu$ M) oder Forskolin (10 $\mu$ M) auf die cAMP-Bildung	18
3.1.2	Konzentrationsabhängige Wirkung von Isoprenalin auf die cAMP-Bildung	20
3.1.3	Konzentrationsabhängige Wirkung von Forskolin auf die cAMP-Bildung	20
3.1.4	Konzentrationsabhängige Hemmung der basalen cAMP-Bildung durch Carbachol, bei Vorstimulation mit Isoprenalin (10 $\mu$ M) oder Forskolin (10 $\mu$ M)	21
3.1.5	Konzentrationsabhängige Wirkung von U-50,488 auf die basale cAMP-Bildung, bei Vorstimulation mit Isoprenalin (10 $\mu$ M) oder Forskolin (10 $\mu$ M)	23

3.2	cAMP-Bildung durch die Adenylylcyclase in frischen Membranpräparationen aus ventrikulären Kardiomyozyten	25
3.2.1	Konzentrationsabhängige Wirkung von Isoprenalin auf die cAMP-Bildung	25
3.2.2	Konzentrationsabhängige Wirkung von Forskolin auf die cAMP-Bildung	26
3.2.3	Konzentrationsabhängige Hemmung der basalen cAMP-Bildung durch Carbachol, bei Vorstimulation mit Isoprenalin (10 $\mu$ M) oder Forskolin (10 $\mu$ M)	26
3.2.4	Konzentrationsabhängige Wirkung von U-50,488 auf die basale cAMP-Bildung, bei Vorstimulation mit Isoprenalin (10 $\mu$ M) oder Forskolin (10 $\mu$ M)	28
3.3	Messung der Zelllängenänderung isolierter, elektrisch stimulierter Kardiomyozyten: Einfluss des Phospholipase C-Inhibitors U-73,122 und des Proteinkinase C-Inhibitors Chelerythrin auf die Zelllängenänderung in Anwesenheit von Isoprenalin und Isoprenalin mit U-50,488	30
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung / Summary</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>53</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Opioide

Opium wird aus dem getrockneten Saft der Schlafmohnkapsel gewonnen. Bereits in Schriften der griechischen und römischen Antike wurde die analgetische und bewusstseinsverändernde Wirkung des Opiums beschrieben. Opium enthält 25 verschiedenen Alkaloide, wovon Morphin und Codein die bekanntesten sind. Der Apotheker Sertürner beschrieb 1805 erstmalig die Isolierung des Morphins aus Opium. 1923 wurde von Gulland und Robinson die Struktur des Morphins aufgeklärt.

Als Opioide werden Stoffe unterschiedlicher Struktur bezeichnet, die Liganden an Opioidrezeptoren sind. Man unterscheidet die Opioidalkaloide, auch Opiate genannt, von den Opioidpeptiden. Neben den natürlich vorkommenden Opioidalkaloiden gibt es vollsynthetische Alkaloide, wie zum Beispiel Pethidin und Methadon. Zu den typischen endogenen Opioidpeptiden zählen  $\beta$ -Endorphin, Dynorphin und Enkephalin. Die endogenen Opioidpeptide werden aus drei inaktiven Vorstufen, dem Prä-Pro-Opiomelanocortin (POMC), dem Prä-Pro-Enkephalin B (Prä-Pro-Dynorphin) und dem Prä-Pro-Enkephalin A gebildet. Diese drei Pro-Peptide werden durch drei separate Gene codiert, die auf drei verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind, und können so in unterschiedlichen Zellen exprimiert werden (Höllt 1993). Die Biosynthese erfolgt über ein Prä-Propeptid. Aus dem Prä-Pro-Opiomelanocortin entstehen das  $\beta$ -Endorphin sowie ACTH (adrenocorticotropes Hormon) und MSH (Melanozyten-stimulierendes Hormon). Aus dem Prä-Pro-Enkephalin B werden das Dynorphin und die Neoendorphine und aus dem Prä-Pro-Enkephalin A werden das Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin gebildet. Davon abzugrenzen sind die atypischen Opioidpeptide, die aus verschiedensten Proteinen freigesetzt werden können und sich durch ihre  $\text{NH}_2$ -terminale Aminosäuresequenz von den typischen Opioidpeptiden unterscheiden (Teschemacher 1993).

Das POMC-Gen wird hauptsächlich in der Adenohypophyse, aber unter anderem auch im Hypothalamus, den Gonaden, den Lymphozyten verschiedener Spezies und Tumoren (Phäochromozytom, kleinzelliges Bronchialkarzinom) exprimiert. Die mRNA des Proenkephalin A wurde in hohen Konzentrationen im Striatum, Hypothalamus,

Rückenmark, den Gonaden, aber auch in ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte nachgewiesen (Howells et al. 1986). Ebenso wurde die mRNA des Prodynorphin im Hypothalamus und Rückenmark der Ratte sowie in ventrikulären Kardiomyozyten des Schweins gefunden (Hölldt 1993).

Im Herzen und in isolierten Kardiomyozyten verschiedener Spezies wurde Dynorphin und die mRNA des Prodynorphin von Spampinato et al. (1991) und von Canossa et al. (1993) nachgewiesen. Howells et al. (1986) und Springhorn et al. (1992) gelang der Nachweis von Enkephalin und der mRNA des Proenkephalin, Millington et al. (1993) und Forman et al. (1992) der Nachweis von  $\beta$ -Endorphin und der mRNA des Pro-Opiomelanocortins in Herzzellen der Ratte.

## **1.2 Opioidrezeptoren**

Der Nachweis spezifischer Opioidrezeptoren gelang im Jahre 1973 verschiedenen Forschergruppen (Pert und Snyder 1973, Simon et al. 1973, Terenius 1973). Nur zwei Jahre später entdeckten Hughes et al. (1975) die Enkephaline, eine Gruppe endogener Liganden für diese Rezeptoren. Die Beschreibung weiterer endogener Liganden folgte: 1976 entdeckten Li et al. das  $\beta$ -Endorphin, auch endogenes Morphin genannt, und 1979 Goldstein et al. das Dynorphin. Das charakteristische Merkmal dieser endogenen Opioid-Peptide ist ihre N-terminale Aminosäuresequenz Tyr-Gly-Gly-Phe, mit der sie in Wechselwirkung mit ihrem jeweiligen Rezeptor treten. Die frühen Kenntnisse über Opioidrezeptoren wurden vor allem durch pharmakologische Bindungsversuche gewonnen. Es wurde deutlich, dass mehrere Rezeptortypen existieren, zu denen die Liganden unterschiedliche Affinitäten aufwiesen.

Martin et al. (1976) beschrieben drei verschiedene Rezeptoren und benannten diese nach den in der Studie verwendeten Substanzen:  $\mu$  für Morphin, das Analgesie, Miosis, Bradykardie und Hypothermie induziert,  $\kappa$  für Ketocyclazosin, das Miosis, Sedation und eine Abschwächung der Flexorenreflexe verursacht, und  $\delta$  für SKF 10,047 oder N-Allylnormetazosin mit seinen Wirkungen wie Mydriasis, Tachykardie und Delir. Der  $\delta$ -Rezeptor wurde von Lord und Mitarbeitern (1977) am Vas deferens in Nierengewebe der Maus entdeckt.



Pharmakologen verwenden seither die griechischen Buchstaben zur Bezeichnung der Rezeptoren. Molekularbiologen dagegen benannten den  $\delta$ -,  $\kappa$ - und  $\mu$ -Rezeptor in DOR, KOR und MOR um. Beide Nomenklaturen geben jedoch wenig Auskunft über die Merkmale der einzelnen Rezeptortypen. Deshalb veröffentlichte die IUPHAR (International Union of Pharmacology) 1996 neue Richtlinien zur Klassifizierung der Rezeptoren (Dhawan et al. 1996). Darin wird der  $\delta$ -Rezeptor als OP<sub>1</sub>-Rezeptor bezeichnet, da er 1992 als erster kloniert werden konnte (Evans et al. 1992, Kieffer et al. 1992). Der endogene Ligand mit der höchsten Affinität zu diesem Rezeptor ist das Enkephalin. OP<sub>2</sub> bezeichnet den  $\kappa$ -Rezeptor, an dem bevorzugt Dynorphin bindet (Chavkin et al. 1982) und der  $\mu$ -Rezeptor wurde in OP<sub>3</sub> umbenannt. Sein endogener Ligand ist das  $\beta$ -Endorphin. Diese Nomenklatur konnte sich allerdings nicht durchsetzen. In Veröffentlichungen ist weiterhin die Benennung der Rezeptoren mittels der griechischen Buchstaben üblich. Ende 1999 tagte deshalb das Rezeptor-Nomenklatur-Komitee der IUPHAR erneut und empfiehlt bis heute die Beibehaltung der Bezeichnung der Rezeptoren mit griechischen Buchstaben. Eine neue einheitliche Nomenklatur werde aber in verschiedenen Gremien weiter diskutiert (siehe <http://www.iuphar.org>). Erschwerend kam hinzu, dass 1994 der ORL1/LC132-Rezeptor entdeckt wurde (Mollereau et al. 1994, Bunzow et al. 1994), der strukturell den Opioidrezeptoren sehr ähnlich ist. Der bisher bekannte endogene Ligand für diesen Rezeptor bekam von den beiden Arbeitsgruppen, die ihn zeitgleich entdeckten, zwei Namen: Nozizeptin und Orphanin FQ (Meunier et al. 1995, Reinscheid et al. 1995). Der Rezeptor wird deshalb häufig auch N/OFQ-Rezeptor genannt.

Im Folgenden werden für die Bezeichnung der Rezeptoren die griechischen Buchstaben verwendet.

### **1.3 Signaltransduktion**

Opioidrezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Blume et al. 1978a, b, Childers und Snyder 1979, 1980) und beeinflussen verschiedene second messenger-Systeme, wie z.B. die Adenylcyclase (AC), K<sup>+</sup>-Kanäle, Ca<sup>++</sup>-Kanäle und den Phosphoinositolumsatz. Eine Übersicht gibt Childers (1993). G-Proteine sind heterotrimere Proteine, die aus einer  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -Untereinheit

bestehen. Im inaktiven Zustand befindet sich der G-Proteinkomplex ( $\alpha\beta\gamma$ ) an der intrazellulären Seite des transmembranen Rezeptors. Wird der Rezeptor durch die Bindung eines Agonisten aktiviert, bewirkt er durch Konformationsänderung am G-Protein, dass GDP von der  $\alpha$ -Untereinheit, an die es gebunden ist, dissoziiert. Nun kann GTP an die  $\alpha$ -Untereinheit binden und dieses bewirkt, dass das G-Protein vom Rezeptor dissoziiert und sich in seine Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta\gamma$ ) aufteilt. Der  $\alpha$ -GTP-Komplex bindet dann an verschiedene Effektorenzyme (z.B. AC), an Rezeptoren oder Ionenkanäle und moduliert deren Aktivität. Die  $\alpha$ -Untereinheit besitzt selbst GTPase-Aktivität, so dass das  $\alpha$ -GTP durch Phosphatabsplaltung in  $\alpha$ -GDP übergeht und sich so selbst inaktiviert. Nach Reassoziierung mit einer  $\beta\gamma$ -Untereinheit steht das G-Protein für einen erneuten Signalübermittlungszyklus zur Verfügung. Die  $\beta\gamma$ -Untereinheit kann ebenfalls die Aktivität eines Effektors beeinflussen, entweder unabhängig von der  $\alpha$ -GTP-Wirkung oder parallel dazu. Der Ligand-Rezeptor-Komplex aktiviert einerseits das G-Protein und andererseits beeinflusst das aktivierte G-Protein die Bindungseigenschaften des Rezeptors für den Liganden.

Die Adenylylcyclase (AC), ein integrales Membranprotein, bewirkt die Bildung von cAMP aus ATP. Man unterscheidet neun Subtypen dieses Enzyms (AC1 - AC9). Ihre Gen-Expression ist gewebespezifisch. Die Heterogenität der AC-Isoformen erlaubt eine gewebe- bzw. zellspezifische Antwort auf ein extrazelluläres Signal (Tab.1).

Tabelle 1: Vorkommen der Subtypen der Adenylylcyclase (AC)

AC-Typ	Ort der mRNA-Expression
AC1	Gehirn, Retina, Nebennierenmark
AC2	Gehirn, Lunge
AC3	Riechnerven, Gehirn, Retina, Aorta, Lunge, Hoden
AC4	Niere, Gehirn, Herz, Leber, Lunge
AC5	Herz, Gehirn, Niere
AC6	Herz, Gehirn, Niere, Hoden, Milz, Leber
AC7	Lunge, Herz, Milz, Niere, Gehirn
AC8	Gehirn
AC9	Skelettmuskulatur, Gehirn, Niere, Lunge, Leber, Herz

(entnommen aus Simonds (1999))

Alle Subtypen werden über ein  $G_s$ -Protein und alle, außer der AC9, durch Forskolin (Substanz aus der indischen Pflanze *Coleus forskoli*) stimuliert. Die Aktivität der AC kann durch PTX-sensitive  $G_i$ -Proteine gehemmt werden (Simonds 1999).

Am besten untersucht ist die Hemmung der AC-Aktivität durch Opioide an Neuroblastoma X Glioma Zellen der Maus (NG108-15) (Traber et al. 1975, Sharma et al. 1975a, 1977), die eine hohe Opioidrezeptordichte aufweisen (Hamprecht 1977). Die Rezeptoren, die diese Zelllinie exprimiert, entsprechen unter pharmakologischen Gesichtspunkten dem  $\delta$ -Rezeptor (Chang et al. 1981). An Zellen anderer Zelllinien, z.B. der humanen Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y, konnte auch der  $\mu$ -Rezeptor untersucht werden (Yu et al. 1986, 1990). Die Zellen der SH-SY5Y Zelllinie exprimieren sowohl den  $\delta$ -Rezeptor, als auch den  $\mu$ -Rezeptor. Die Ergebnisse von Yu et al. (1986, 1990) zeigen, dass beide Rezeptortypen in diesen transformierten Zellen über ein inhibitorisches G-Protein an die AC gekoppelt sind. Dies wurde auch für den  $\kappa$ -Rezeptor gezeigt (Attali et al. 1989, Konkoy und Childers 1989).

Die ersten Untersuchungen zur Wirkung von Opioidagonisten auf die AC wurden an Membranen von Nervenzellen vorgenommen (Chou et al. 1971, Collier und Roy 1974). Die Experimente zeigten, dass Morphin die  $PGE_1$ -stimulierte AC hemmt und Naloxon diese Hemmung antagonisiert. Diese Ergebnisse wurden kontrovers diskutiert. Sie waren zum Teil nicht reproduzierbar, da die opioidvermittelte Hemmung der AC in diesen Membranpräparaten nur sehr gering war. Das ist wahrscheinlich auf eine Zerstörung der physiologischen Kopplung von Membranrezeptor, G-Protein und AC und auf die Heterogenität des Gewebes zurückzuführen. Rasenick und Childers (1989) konnten zeigen, dass die signifikante Hemmung der AC durch Opioide verdeckt wurde, wenn gleichzeitig eine hohe  $G_s$ -Protein vermittelte Stimulation der AC vorlag.

Von diesen akuten Effekten der Opioide auf die AC-Aktivität sind diejenigen abzugrenzen, die unter chronischer Opioidagonist-Behandlung zu beobachten sind. Das AC-System reagiert auf die chronische Opioidagonist-Wirkung mit einer Erhöhung der basalen Aktivität. Der inhibitorische Effekt der Opioide scheint deshalb abgeschwächt, denn bei maximaler Hemmung wird die basale Aktivität der AC gemessen (Sharma et al. 1975b, 1977).

## 1.4 Die Funktion des endogenen Opioidsystems

Die Opioidpeptide vermitteln ihre Wirkung durch Interaktion mit spezifischen Rezeptoren, den Opioidrezeptoren, die sowohl prä- als auch postsynaptisch an Neuronen vorkommen. So beeinflussen sie viele Funktionen des ZNS, wie z.B. Nozizeption, kardiovaskuläre Regulation, Thermoregulation, Atmung, neuroendokrine Aktivität, Sexual- und Stressverhalten (Adler et al. 1988, Herz und Millan 1988, Pasternak 1988, Stefano 1989).

Schon 1983 beschrieb Holaday die Wirkung von Opioiden am kardiovaskulären System. Die Interpretation der Ergebnisse der folgenden Jahre ist jedoch schwierig, da die Effekte der Opioide stark abhängig sind von den Versuchsbedingungen und dem verwendeten Tiermodell. So beeinflusst der Ort der Applikation des zu untersuchenden Opioids die Versuchsergebnisse: Holaday konnte 1982 zeigen, dass die Injektion eines Opioids in den dritten oder vierten Ventrikel von Ratten die Herzfrequenz und den Blutdruck unterschiedlich modulierte. Wang et al. (1989) verabreichten das Enkephalinanalogon FK 33-824 zunächst intracerebroventrikulär und beobachteten einen Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks, die intravenöse Gabe des gleichen Pharmakons dagegen verursachte Bradykardie. Auch die Art der Anästhesie während der Versuche führte zu gegensätzlichen Ergebnissen. Yukimura et al. (1981) behandelte anästhesierte Ratten intracerebroventrikulär mit [D-Ala<sup>2</sup>]met-enkephalinamid (DAME) und induzierte damit Hypotension, während es bei nicht-anästhesierten Ratten zu einer dosisabhängigen Hypertension kam. Weitere beeinflussende Größen sind die Atmungslage der Tiere (Spontanatmung versus künstliche Beatmung) und die Spezies der verwendeten Tiere. So fand man gegensätzlich Effekte bei der Ratte und beim Hund, sowohl hinsichtlich des verwendeten Opioidtyp als auch der applizierten Dosis (Laubie et al. 1977, Bellet et al. 1980).

Neben den zentral vermittelten Wirkungen der Opioide am kardiovaskulären System, wie der Modulation der Herzfrequenz und des Blutdrucks, konnten auch direkte Wirkungen am Herzen gezeigt werden (Gautret und Schmitt 1985). Um einige der vielen Einflussfaktoren auszuschließen, verließ man das Ganztiermodell (Faden 1993) und kam über Untersuchungen am perfundierten Organ (Clô et al. 1985,

Ventura et al. 1987, Xia et al. 1994) und an isolierten Muskelpräparaten (Goldberg und Padgett 1969) zu einem Modell, in dem einzelne Herzzellen untersucht werden. In Rattenherzen wurden mit Bindungsversuchen  $\delta$ - und  $\kappa$ -Rezeptoren nachgewiesen (Krumins et al. 1985, Krumins 1987, Ventura et al. 1989), wobei der  $\kappa$ -Rezeptor vorherrschend ist (Tai et al. 1991, Jin et al. 1995, Zimlichman et al. 1996). Eine selektive Stimulation der  $\kappa$ - und  $\delta$ -Rezeptoren in isolierten, elektrisch stimulierten, ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte führt zu einer Reduktion der Kontraktionsamplitude (Ventura et al. 1992, Wenzlaff et al. 1998) und zu einer Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Ventura et al. 1992, Sheng et al. 1997). Auch unter Stimulation  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren sind diese Effekte nachweisbar (Pepe et al. 1997, Xiao et al. 1997, Yu et al. 1998). Dies lässt eine Interaktion zwischen Opioidrezeptor und  $\beta$ -adrenergem Rezeptor am Kardiomyozyten vermuten. Die Art der Interaktion ebenso wie die intrazelluläre Signaltransduktion, über die die Abnahme der Kontraktionsamplitude vermittelt wird, sind unbekannt.

Brodde et al. (1992, 1995) zeigten am Herzen eine funktionelle Interaktion zwischen  $\beta$ -adrenergem Rezeptor und dem muskarinischen Acetylcholinrezeptor über eine Beeinflussung der AC. Eine Kopplung des  $\kappa$ -Opioidrezeptors an ein PTX-sensitives G-Protein wurde nachgewiesen (Sheng et al. 1997, Xiao et al. 1997, Bian et al. 1998b, Wenzlaff et al. 1998). Ob dieses G-Protein eine Wirkung an der AC vermittelt, war bisher nicht untersucht worden.

## **1.5 Aufgabenstellung**

In vorangegangenen Untersuchungen konnte Wenzlaff et al. (1998) zeigen, dass der selektive  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonist U-50,488, auch unter Vorstimulation mit Isoprenalin, zu einer Reduktion der Kontraktionsamplitude in isolierten, elektrisch stimulierten, ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte führte, während der  $\delta$ - und  $\mu$ -Rezeptoragonist DADLE keine Änderung bewirkte. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob dieser Effekt über die Adenylylcyclase (AC) vermittelt wird. Hierzu wurde die AC-Aktivität in Membranpräparationen ventrikulärer Kardiomyozyten gemessen. Zunächst erfolgte die Bestimmung der basalen AC-Aktivität sowie der AC-Aktivität unter dem stimulatorischen Einfluss von Isoprenalin

und Forskolin und unter dem inhibitorischen Einfluss von Carbachol. Bekannt war, dass Isoprenalin nach Bindung an den  $\beta$ -Adrenozeptor über ein stimulatorisches G-Protein die AC-Aktivität beeinflusst, während Carbachol nach Bindung an einen muskarinischen Acetylcholinrezeptor über ein inhibitorisches G-Protein die AC-Aktivität hemmt. Ob der  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonist U-50,488 seine Wirkung ebenfalls über ein inhibitorisches G-Protein vermittelt, war für die AC bislang nicht gezeigt worden.

Mit den Messungen der AC-Aktivität unter Isoprenalin- und Carbachol-Einfluss konnte in den angefertigten Membranpräparationen gezeigt werden, dass der Komplex aus membranständigem Rezeptor, regulierenden G-Proteinen und AC intakt ist. Danach wurde der Effekt von U-50,488 auf die AC-Aktivität untersucht. Weiterhin erfolgten mittels Kontraktilitätsmessungen orientierende Untersuchungen an der Phospholipase C und der Proteinkinase C als weitere mögliche Signaltransduktionswege.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Lösungen

#### Homogenisationspuffer

Sucrose (Saccharose)	27% (w/v)
EDTA	1 mM
HEPES	20 mM
pH 7,8 mit NaOH eingestellt	

#### Kraftbrühe (power soup)

KCl	70,0 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30,0 mM
Taurin	20,0 mM
Glucose x 1H <sub>2</sub> O	20,0 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	5,0 mM
Bernsteinsäure	5,0 mM
Creatin x 1H <sub>2</sub> O	5,0 mM
EGTA	1,0 mM
β-Hydroxybuttersäure	7,3 mM
Brenztraubensäure	5,0 mM
Na <sub>2</sub> ATP	5,0 mM
pH 7,4 mit KOH eingestellt, danach steril filtriert	

#### Lösungen zur Proteinbestimmung

##### Lösung A

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2% (w/v)
NaOH	0,4% (w/v)
Na-Tartrat	0,16% (w/v)
SDS	1% (w/v)

##### Lösung B

CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	4% (w/v)
---------------------------------------	----------

### **Lösungen zum Spülen der Aluminiumoxid-Säulen**

HCl	1 M
Imidazol	0,1 M
(pH 7,4 mit rauchender HCl eingestellt)	
NaOH	2 M

### **MOPS-Puffer**

NaCl	100,0 mM
KCl	10,0 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	5,0 mM
Glucose x 1H <sub>2</sub> O	20,0 mM
Taurin	50,0 mM
MOPS	10,0 mM
pH 6,9 mit KOH eingestellt	

### **Reaktionslösung**

Tris-HCL	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
EDTA	1 mM
IBMX	
cAMP	1 mM
DTT	1 mM
Creatinphosphat	20 mM
Creatinkinase	100 U/ml
ATP	100 µM
GTP	10 µM
BSA	0,2% (w/v)
[α <sup>32</sup> P]ATP	0,5-1,0 µCi

### **Resuspensionspuffer**

EDTA	1 mM
HEPES	20 mM
pH 7,8 mit NaOH eingestellt	



### Stop-Lösung

ATP	4 mM
cAMP	1,4 mM
SDS	2% (w/v)
[ <sup>3</sup> H]c-AMP	10000 cpm/500µl

### Tyrodelösung

NaCl	119,8 mM
KCl	5,4 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,05 mM
Glukose	5,0 mM
HEPES	5,0 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	0,05 mM
Ascorbinsäure	0,28 mM

pH 7,4 mit NaOH eingestellt, danach wird CaCl<sub>2</sub> (Stammlsg. 2,25 M) bis zu einer Konzentration von 1,8 mM zugegeben

## 2.2 Gewinnung der Kardiomyozyten

Die Versuchstiere männlichen Geschlechts hatten ein Körpergewicht von  $300 \pm 10$  g (n= 80). Sie wurden bei konstanter Raumtemperatur ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) und kontrollierten Lichtverhältnissen (12 Stunden Licht-Dunkel-Rhythmus) gehalten und hatten dabei freien Zugang zu Wasser und handelsüblichem Futter.

Nach dem Töten der Tiere (2 Wistar-Ratten pro Präparation) durch zervikale Dislokation und Entbluten aus den Karotiden wurden die Herzen schnell entnommen und in ein Gefäß mit vorher O<sub>2</sub>-begastem MOPS-Puffer (37°C) gegeben. Danach wurde die Aorta kanüliert und an einer modifizierten Langendorff-Apparatur fixiert. Die Herzen wurden zunächst mit kalziumfreien MOPS-Puffer nicht rezirkulierend, retrograd perfundiert (3 min, 10 ml/min), um Erythrozyten heraus zu waschen. Die Separation der Zellen wurde durch Zugabe von Kollagenaselösung (0,1% w/v in MOPS-Puffer) gestartet. Nach 15 min (bei 300 g schwerem Tier) wurden die Herzen

von der Apparatur genommen, die Vorhöfe abtrennt und das Ventrikelgewebe mit zwei Skalpellen zerkleinert. Das Gewebe eines Herzens wurde in 20 ml Kraftbrühe aufgenommen und 30 min bei 37°C im Wasserbad (Köttermann, Hänsingen) mit langsamen Schüttelmodus inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension durch ein Nylongewebe mit einer Maschengröße von 200 µm filtriert und 3 min bei 48 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 10 ml MOPS-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 37,5 µl einer 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung erneut für ca. 5 min im Wasserbad inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann auf eine 6 %ige Albuminlösung aufgeschichtet und 2 min bei 48 x g zentrifugiert, um eine Ausbeute von mehr als 99% Kardiomyozyten zu erhalten.

### **2.3 Membranpräparation**

Nach dem letzten Zentrifugationsschritt der Zellpräparation wurde das Pellet in 5 ml MOPS-Puffer resuspendiert und die Kardiomyozyten-Suspension bei 4°C, 5 min und 275 x g zentrifugiert. Die so gereinigten Zellen wurden in 500 µl Homogenisationspuffer aufgenommen und in den vorher gekühlten Dounce-Homogenisator (Braun, Melsungen) pipettiert. Bei 900 Umdrehungen pro min und 10 Strokes wurden aus den Zellen Membranfragmente gewonnen. Die Membransuspension eines Herzens wurde auf zwei Eppendorfgefäße aufgeteilt. Nach Ausgleichen des Gewichts wurden die Proben bei 4°C, 10 min und 20000 x g zentrifugiert. Nach der Präparation wurden die Membranen in Resuspensionspuffer aufgenommen und entweder direkt im Assay verwendet oder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff, bei -80°C gelagert.

### **2.4 Proteinbestimmung**

Zur Proteinbestimmung wurde die Methode nach Lowry et al. in einer modifizierten Form verwendet (Holtzhauer 1997), die die Oxidierbarkeit aromatischer Aminosäuren ausnutzt.

Aus der Membransuspension wurden vier Verdünnungen hergestellt (1/40, 1/100, 1/200, 1/500). Von diesen Verdünnungen wurden 200 µl abpipettiert und 1000 µl eines Gemisches aus 20 ml Lösung A und 200 µl Lösung B zugegeben. Danach wurden die Proben 10 min geschüttelt und anschließend nach Zugabe von 100 µl

Folinlösung und sofortigem Schütteln 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion der Ansätze wurde dann bei einer Wellenlänge von 750 nm im Photometer gemessen.

Da die Reaktionsbedingungen von Bestimmung zu Bestimmung geringfügig schwanken können, und die Eichkurve bei hohem Proteingehalt nicht linear verläuft, wurde bei jeder Analyse eine Standardproteinreihe im Bereich von 0 bis 200 µg/ml gemessen. Die Stammlösung enthielt 1,0 mg Ovalbumin in 1 ml dest. Wasser. Die benötigte Verdünnungsreihe wurde bei -20°C gelagert. Anhand der erstellten Standardkurve wurde der Proteingehalt der Membranverdünnungen errechnet und die benötigte Membranverdünnung (40µg/20µl) hergestellt.

## **2.5 Adenylylcyclase-Assay**

**Herstellung der AG<sup>®</sup>50W-Kationenaustauschharz-Säulen:** Von der Trockensubstanz des Kationenaustauschharzes AG<sup>®</sup>50W (AG<sup>®</sup>50W-X8 Resin, 200-400 mesh hydrogen form, Bio-Rad Laboratories, München) wurde mit Aqua dest. eine 50%ige Suspension angesetzt und über Nacht quellen gelassen. Anschließend wurde das Harz mit Aqua dest. gewaschen, bis der Überstand farblos und frei von Partikeln war. Nachdem sich das Harz abgesetzt hat, wurde der Überstand abgesaugt und erneut eine 50% (w/v) Suspension hergestellt. 2,6 ml dieser Suspension wurden in jede Säule (Poly-Prep<sup>®</sup>-Chromatographie-Säulen, Bio-Rad Laboratories, München) geschichtet. Vor dem ersten Gebrauch wurden die Säulen mit folgenden Substanzen in angegebener Reihenfolge gewaschen: 2 x 10 ml Aqua dest., 2 x 10 ml 2 M NaOH, 2 x 10 ml Aqua dest., 2 x 10 ml 1 M HCl, 6 x 10 ml Aqua dest.. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Zur Lagerung wurden die Säulen mit 1M HCl gespült und eingetrocknet gelagert.

**Herstellung der Aluminiumoxid-Säulen:** In jede Säule wurde 1,2 g Aluminiumoxid (Aluminiumoxid 90 aktiv, neutral, Aktivitätsstufe 1, 70-230 mesh ASTM, Merck, Darmstadt) gefüllt und mit 5 ml Aqua dest. überschichtet. Durch sofortiges Rühren mit einer Plastikpasteurpipette wurden Luftblasen entfernt. Die Säulen wurden vor dem ersten Gebrauch mehrfach mit 5 ml Aqua dest. gewaschen und zum Schluss mit 5 ml 0,1 M Imidazolösung umgepuffert. Unter Luftabschluss und mit 5 ml Aqua dest. beschichtet wurden die Aluminiumoxid-Säulen immer feucht aufbewahrt.

Von den neuen Säulen wurde vor dem ersten Versuch ein Elutionsprofil erstellt. Dazu wurde ein Versuch durchgeführt, in dem nur [ $^3\text{H}$ ]-cAMP auf die Säulen gegeben wurde. Alle Fraktionen wurden in 1 ml Schritten gesammelt, anschließend mit Szintillator (Aquasafe 300 Plus Szintillator, Zinsser Analytic, Frankfurt Main) versetzt und im  $\beta$ -Counter (Liquid Scintillation Counter, 1410  $\beta$ -Counter, LKB Wallac, Turku, Schweden) gezählt. Die Fraktionen, die den Hauptanteil an [ $^3\text{H}$ ]-cAMP enthielten, wurden bei den späteren Versuchen für die Auswertung gesammelt.

**Assay:** Die verwendete Methode zur Bestimmung der AC-Aktivität wurde von Salomon et al. (1974) in Anlehnung an die Methoden von Krishna et al. (1968) und White et al. (1971) beschrieben. [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP wird als Substrat verwendet. Das gebildete [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-markierte cAMP wird vom Restsubstrat und anderen Nukleotiden durch eine Doppelsäulenchromatographie getrennt. ATP wird während der Inkubation durch die AC zu cyclischem AMP, aber durch spezifische und unspezifische ATPasen auch zu ADP und AMP umgesetzt. Da eine Abnahme der initialen ATP-Konzentration eine Änderung der Enzymaktivität vorgibt, wurde als ATP-regenerierendes System Creatinphosphat und Creatinkinase zugesetzt.

Während der Inkubation gebildetes cAMP wird durch Phosphodiesterasen zu 5'-AMP abgebaut. Um diesen Abbau zu verhindern wird nicht-markiertes cAMP und der Phosphodiesterasehemmstoff IBMX der Reaktionslösung zugesetzt.

#### Reaktionslösung:

50	mM	Tris-HCL
10	mM	MgCl <sub>2</sub>
1	mM	EDTA
1	mM	IMBX
1	mM	cAMP
1	mM	DTT
20	mM	Creatinphosphat
100	U/ml	Creatinkinase
100	$\mu\text{M}$	ATP
10	$\mu\text{M}$	GTP
0,2	%	BSA
0,5-1,0	$\mu\text{Ci}$	[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP

Zu 10 µl der zu untersuchenden Substanz (Isoprenalin, Forskolin, Carbachol oder U-50,488) wurden 70 µl Reaktionslösung gegeben. Bei der Kontrolle wurden zum Volumenausgleich 10 µl Aqua dest. verwendet. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 20 µl (20 – 40 µg Protein/Ansatz) Membransuspension gestartet. Nach 20 Minuten Inkubation bei 32°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl Stop-Lösung beendet.

Die AG<sup>®</sup>50W-Säulen wurden mit 5 x 10 ml Aqua dest. gespült. Die Aluminiumoxid-Säulen wurden vor der Benutzung mit 3 ml Imidazollösung gespült.

Direkt nach dem Beenden der Reaktion wurde der Reaktionsansatz jeweils komplett auf die AG<sup>®</sup>50W-Säulen gegeben. Die Reaktionsröhrchen wurden mit 3,4 ml Aqua dest. gespült, die ebenfalls auf die Säulen gegeben wurden. Das Eluat wurde verworfen und die abgetropften AG<sup>®</sup>50W-Säulen über den Aluminiumoxid-Säulen platziert. Mit 5 ml Aqua dest. wurde das gebundene cAMP von den AG<sup>®</sup>50W-Säulen auf die Aluminiumoxid-Säulen gewaschen. Die Aluminiumoxid-Säulen wurden danach mit 3 ml Imidazollösung gewaschen. Anschließend wurde mit 3 ml Imidazollösung das radioaktiv markierte cAMP von den Aluminiumoxid-Säulen in Szintillationsgefäße eluiert. Das Eluat wurde mit 13 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und nach gründlichem Mischen im β-Counter die Menge an [<sup>3</sup>H]- und [<sup>32</sup>P]-markiertem cAMP gemessen. Die Recovery wurde über das dem Reaktionsansatz zugegebene [<sup>3</sup>H]-cAMP bestimmt.

Die Menge des gebildeten cAMPs wurde in picomol pro Minute Inkubationszeit pro Milligramm Protein der Membransuspension (pmol/min/mg) angegeben. Die Membranen wurden mit Isoprenalin (10 µM) oder Forskolin (10 µM) vorstimuliert. Zur Bestimmung der basalen AC-Aktivität wurde ein entsprechendes Volumen einer Lösung aus 20 mM HEPES, 1 mM EDTA und 2% bovinem Serumalbumin zugesetzt. Im Folgenden wird diese Lösung als Lösungsmittel bezeichnet.

**Austesten verschiedener Reaktionslösungen:** Vor Beginn der Versuche wurden Reaktionslösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an MgCl<sub>2</sub> und EDTA ausgetestet. MgCl<sub>2</sub> wurde in den Konzentrationen 1,5 mM, 4 mM und 10 mM eingesetzt, EDTA wurde 1 mM und 2 mM verwendet (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** AC-Aktivität in Abhängigkeit von EDTA- und MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen

<b>Reamix 1</b> (EDTA 1 mM, MgCl <sub>2</sub> 4 mM)	Unstimuliert	20,9	pmol/min/mg
	Isoprenalin 10 <sup>-6</sup> M	48,04	pmol/min/mg
	Isoprenalin 10 <sup>-8</sup> M	24,5	pmol/min/mg
	Forskolin 100 µM	169,5	pmol/min/mg
<b>Reamix 2</b> (EDTA 2 mM, MgCl <sub>2</sub> 4 mM)	Unstimuliert	13,2	pmol/min/mg
	Isoprenalin 10 <sup>-6</sup> M	42,7	pmol/min/mg
	Isoprenalin 10 <sup>-8</sup> M	20,3	pmol/min/mg
	Forskolin 100 µM	130,1	pmol/min/mg
<b>Reamix 3</b> (EDTA 1 mM, MgCl <sub>2</sub> 10 mM)	Unstimuliert	40,7	pmol/min/mg
	Isoprenalin 10 <sup>-6</sup> M	75,1	pmol/min/mg
	Isoprenalin 10 <sup>-8</sup> M	44,0	pmol/min/mg
	Forskolin 100 µM	185,4	pmol/min/mg

(pmol/min/mg = pmol cAMP/min Inkubation/mg Protein, n = 2)

Nach diesen Ergebnissen wurde Reaktionsgemisch 3 (Reamix 3) für die Versuche ausgewählt. Bei einer Konzentration von 1 mM EDTA und 10 mM MgCl<sub>2</sub> waren sowohl die Basalaktivität als auch die Stimulierbarkeit der Adenylylcyclase durch Isoprenalin und Forskolin am größten.

## 2.6 Visuelle Messung der Zelllängenänderung

Nach dem letzten Zentrifugationsschritt der Zellpräparation wurde das Pellet in Medium 199 (37°C), das mit einer Antibiotikallösung (100 µg/l Streptomycin und 100000 U/l Penicillin) versetzt wurde, resuspendiert und anschließend je 1 ml in Petrischalen ausplattiert. Die Zellkulturschalen wurden am Abend vorher mit fetalem Kälberserum (FKS) beschichtet. Zum Anheften der Zellen an das FKS auf dem Boden der Schalen wurden diese mindestens 1 h im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) gelagert und konnten bis maximal 6 h nach Präparationsbeginn verwendet werden. Die so vorbereiteten Schalen wurden in einer speziell angefertigten Perfusionskammer auf dem Tisch eines Mikroskops (Axiovert 35, Zeiss, Oberkochen) installiert. Die elektrische Reizung erfolgte mit Rechteckimpulsen von 15 ms Dauer

und einer Spannung von 100 V (Reizgerät Pulsar 6i, Frederick Haer & Co) über senkrecht in die Zellsuspension ragende Platinelektroden. Der Eingang zur Perfusionskammer wurde mit dem Zuflussschlauch einer Rollerpumpe (LKB Varioplex 12000, Multiplex 2115) verbunden. So konnten die Zellen mit den zu untersuchenden Testlösungen perfundiert werden. Die Temperatur in den Schalen wurde konstant auf 35°C gehalten. An den Ausgang der Perfusionskammer wurde eine Rollerpumpe angeschlossen und über diesen Abfluss wurde das Volumen in den Schalen reguliert. Ein Bildausschnitt der Myozyten in den Schalen wurde über eine Kamera (DX10-101P, Sony), die an das Mikroskop angeschlossen war (Kamera Adapter CMA-D1CE, Sony), auf den Videomonitor (PVM-1440QM, Sony Triniton) übertragen. Zusätzlich wurden die Bilder auf einem Videoband (Videorecorder VC-MH641 GM, Sharp) gespeichert. Für die Messung der Kontraktilität der Myozyten wurde die systolische und diastolische Zelllänge einzelner Myozyten auf dem Bildschirm im Standbild ausgemessen. Für die Auswertung der Kontraktilität der Myozyten wurden die Messwerte von 3-8 Myozyten pro Petrischale gemittelt.

## **2.7 Statistische Auswertung der Daten**

Die in der vorliegenden Arbeit erfolgte statistische Auswertung und Darstellung der erhobenen Daten erfolgte mit den Programmen Microcal Origin 3.5 und Correl Draw 6.0. Die ermittelten Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Die Signifikanz der Daten wurde mit Hilfe des ungepaarten t-Tests ermittelt. Ein p-Wert kleiner 0,05 kennzeichnet Signifikanz.

### 3 Ergebnisse

Am Myokard der Ratte gibt es  $\delta$ - und  $\kappa$ -Opioidrezeptoren (Krumins et al. 1985, Ventura et al. 1989), wobei der  $\kappa$ -Opioidrezeptor der vorherrschende Rezeptortyp ist (Tai et al. 1991, Jin et al. 1995, Zimlichman et al. 1996). Der selektive  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonist U-50,488 führt über eine Bindung an diese  $\kappa$ -Opioidrezeptoren zu einer Verminderung der Zellverkürzung während der Kontraktion bei elektrisch stimulierten ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte (Wenzlaff et al. 1998). Dieser Effekt besteht sowohl bei unstimulierten, als auch bei Isoprenalin-stimulierten Zellen. Isoprenalin, ein  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonist, beeinflusst über ein stimulatorisches G-Protein direkt die Aktivität der Adenylylcyclase (AC). Wir untersuchten den Effekt von U-50,488 auf die Aktivität der AC, um zu prüfen, ob dieser Effekt mit einer Rezeptorinteraktion zwischen Adrenozeptor und Opioidrezeptor zu erklären ist.

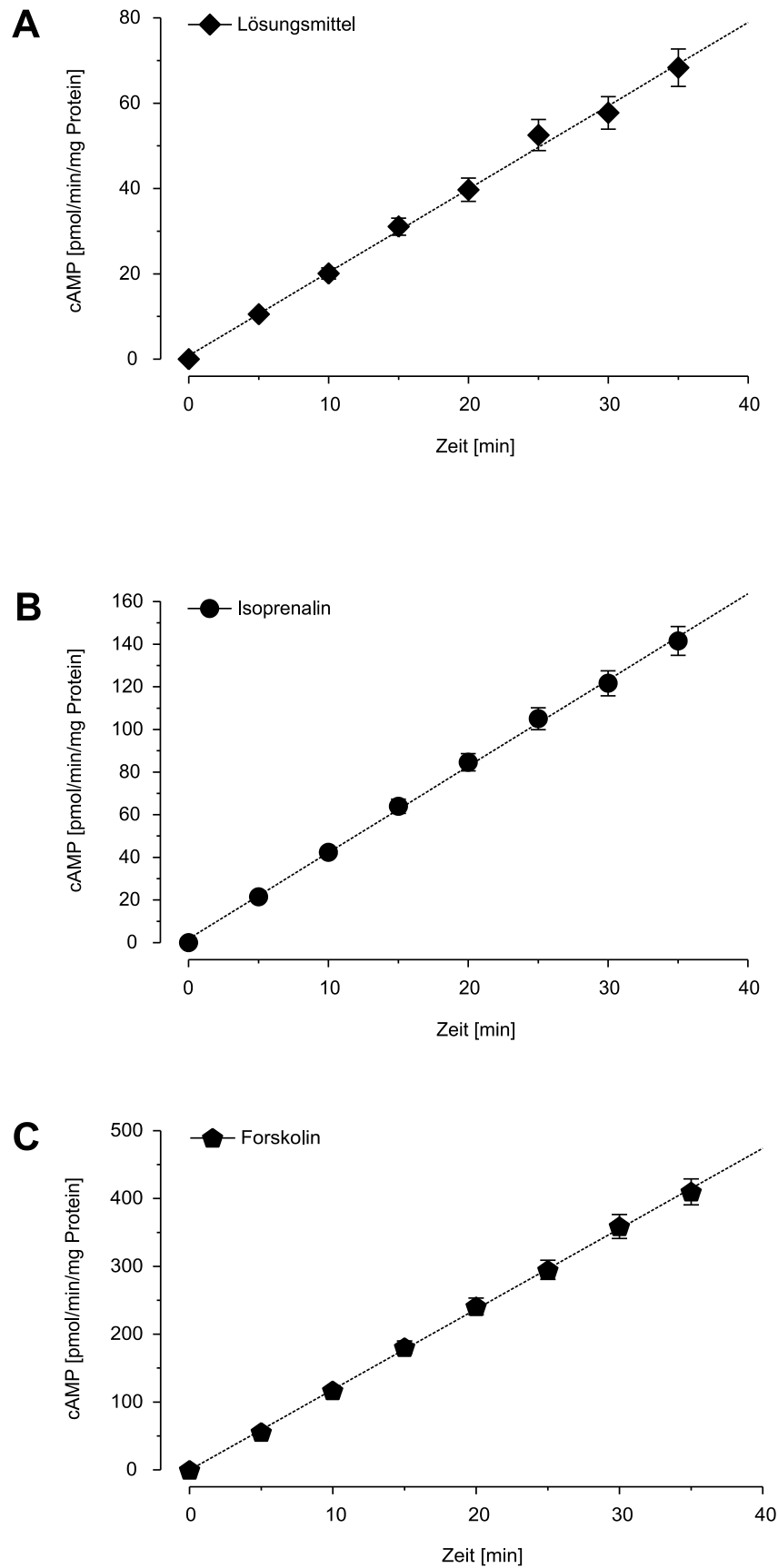
Aus frischen, ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte wurden, wie im Methodenteil beschrieben, Membranen präpariert. Da für die Membranpräparation bereits mehrere Stunden benötigt wurden, wurden diese zunächst eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt im AC-Assay verwendet. Später wurden alle Messungen mit frischen, vorher nicht gefrorenen Membranpräparationen wiederholt, um zu überprüfen, ob der Einfriervorgang eine Änderung der Ergebnisse bewirkte.

#### 3.1 cAMP-Bildung durch die Adenylylcyclase in zuvor gefrorenen Membranpräparationen aus ventrikulären Kardiomyozyten

##### 3.1.1 Zeitabhängige Wirkung von Isoprenalin (10 $\mu$ M) oder Forskolin (10 $\mu$ M) auf die cAMP-Bildung

Abbildung 1 zeigt die Zeitabhängigkeiten der cAMP-Bildung in den Membranpräparationen in der Kontrolle (Abb. 1 A), in Anwesenheit von Isoprenalin (Abb. 1 B) oder von Forskolin (Abb. 1 C). Im untersuchten Zeitfenster von 35 min ergab sich jeweils ein linearer Anstieg der cAMP-Bildung. Beachte die unterschiedlichen Ordinaten bezüglich der cAMP-Menge. Forskolin hat eine außerordentlich stark stimulierende Wirkung.

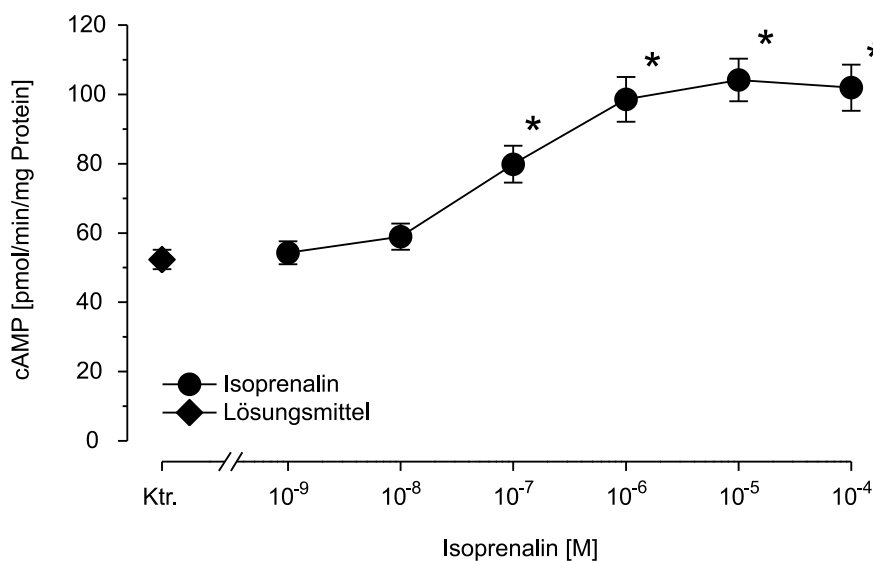




**Abb. 1:** Zeitabhängigkeit der cAMP-Bildung in zuvor gefrorenen Membranpräparationen kardialer Myozyten in (A) Kontrolle (n = 3), (B) in Anwesenheit von Isoprenalin (10  $\mu$ M, n = 4) und (C) von Forskolin (10  $\mu$ M, n = 4). „n“ gibt die Zahl der Herzpräparationen an.

### 3.1.2 Konzentrationsabhängige Wirkung von Isoprenalin auf die cAMP-Bildung

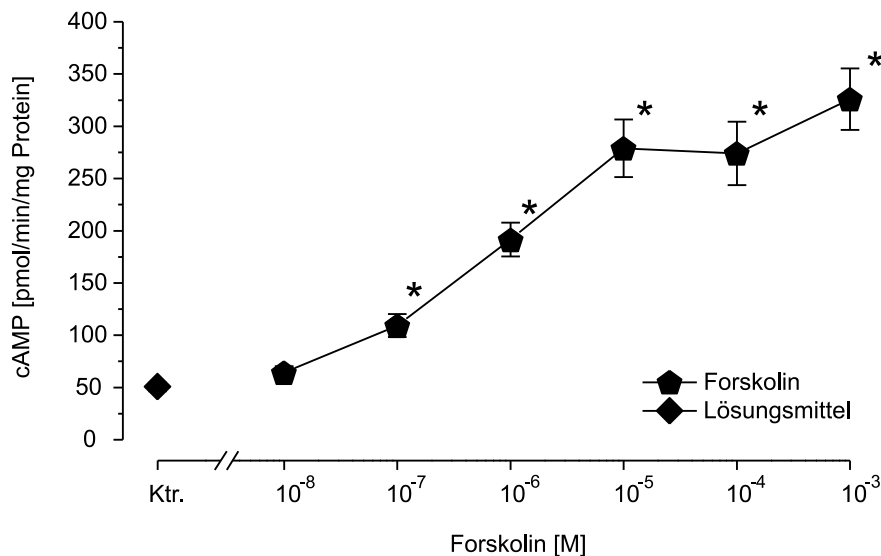
Isoprenalin, ein  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonist, beeinflusst über ein stimulatorisches G-Protein die Aktivität der AC und damit die Bildung von cAMP. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wird die Basalaktivität konzentrationsabhängig von  $52,3 \pm 2,8$  pmol/min/mg Protein auf maximal  $104,2 \pm 6,2$  pmol/min/mg Protein bei einer Isoprenalinkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  gesteigert, was einem Faktor von 2 entspricht (Abb. 2).



**Abb. 2:** Konzentrationsabhängige Wirkung von Isoprenalin auf die cAMP-Bildung in zuvor gefrorenen Membranpräparationen (n = 8). Kontrolle (Ktr.) entspricht der Basalaktivität der AC ohne Stimulation, wobei zum Volumenausgleich eine entsprechende Menge Lösungsmittel eingesetzt wurde. Inkubationszeit 20 min. ★  $p < 0,05$  vs. Ktr.

### 3.1.3 Konzentrationsabhängige Wirkung von Forskolin auf die cAMP-Bildung

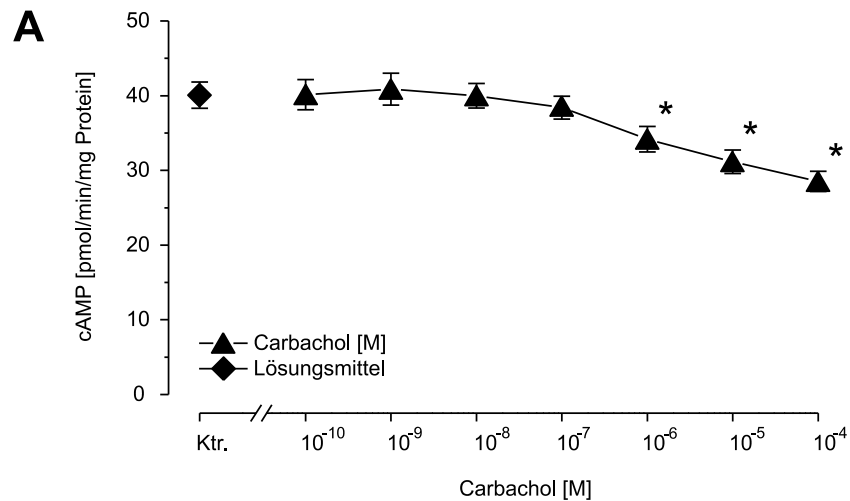
Forskolin stimuliert die AC über direkte Interaktion mit dem Enzym. Konzentrationsabhängig wird die Basalaktivität von  $50,6 \pm 4,1$  pmol/min/mg Protein auf  $279 \pm 28$  pmol/min/mg Protein bei einer Forskolinkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  gesteigert, was einem Faktor von 5,5 entspricht (Abb.3).



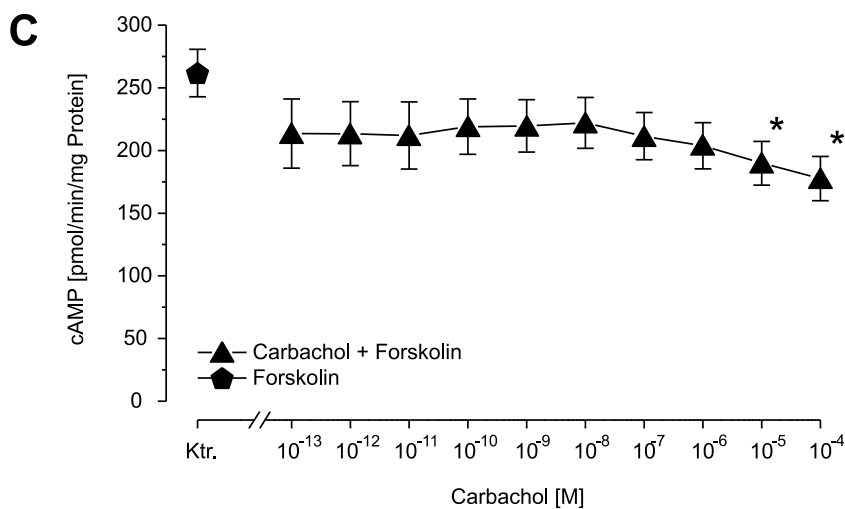
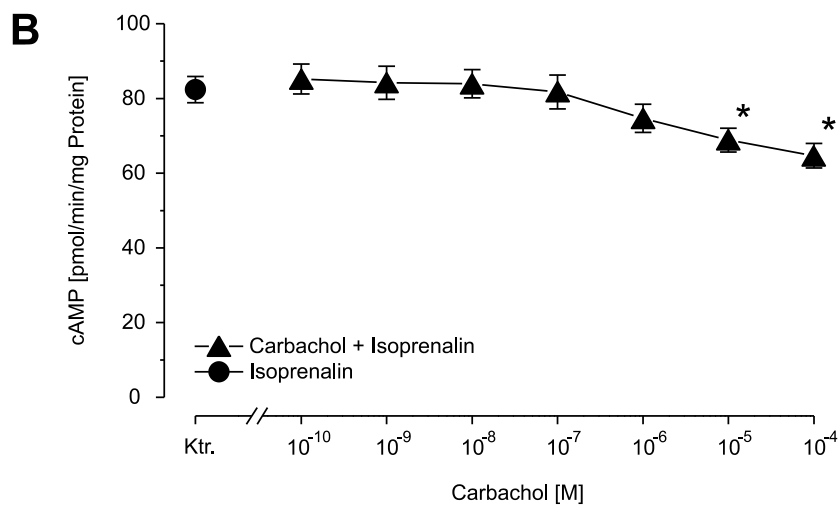
**Abb. 3:** Konzentrationsabhängiger Effekt von Forskolin auf die cAMP-Bildung in zuvor gefrorenen Membranpräparationen (n = 5). Kontrolle (Ktr.) entspricht der Basalaktivität der AC ohne Stimulation, wobei zum Volumenausgleich eine entsprechende Menge Lösungsmittel eingesetzt wurde. Inkubationszeit 20 min. ★ p < 0,05 vs. Ktr.

### 3.1.4 Konzentrationsabhängige Hemmung der basalen cAMP-Bildung durch Carbachol, bei Vorstimulation mit Isoprenalin (10 µM) oder Forskolin (10 µM)

Carbachol, ein nikotinischer und muskarinischer Acetylcholinrezeptoragonist, kann über ein inhibitorisches G-Protein die AC beeinflussen. Es gibt 5 verschiedene Subtypen des muskarinischen Acetylcholinrezeptors (Bonner et al. 1987, 1988), wobei der M<sub>2</sub>-Rezeptor im kardialen Gewebe exprimiert wird (Levey 1993). Die Bindung von Carbachol an diese Rezeptoren resultiert in einer konzentrationsabhängigen, signifikanten Reduktion der basalen AC-Aktivität, bei Carbacholkonzentrationen im mikromolaren Bereich (Ehlert et al. 1989, Wei und Wang 1990), von  $40,1 \pm 1,8$  pmol/min/mg Protein auf maximal  $28,5 \pm 1,3$  pmol/min/mg Protein (28,9% Reduktion) (Abb. 4 A). Auch die zuvor gezeigte Stimulation der AC durch Isoprenalin (Abb. 1B) oder Forskolin (Abb. 1C) wird durch Carbachol reduziert. Unter Vorstimulation mit Isoprenalin (10 µM) reduziert Carbachol die cAMP-Bildung durch die AC von  $82,4 \pm 3,5$  pmol/min/mg Protein auf  $64,7 \pm 3,3$  pmol/min/mg Protein (21,5% Reduktion) (Abb. 4 B), sowie unter Vorstimulation mit Forskolin (10 µM) von  $262 \pm 19$  pmol/min/mg Protein auf  $178 \pm 18$  pmol/min/mg Protein (32,1% Reduktion) (Abb. 4 C).



\*  $p < 0,05$  vs. Ktr.

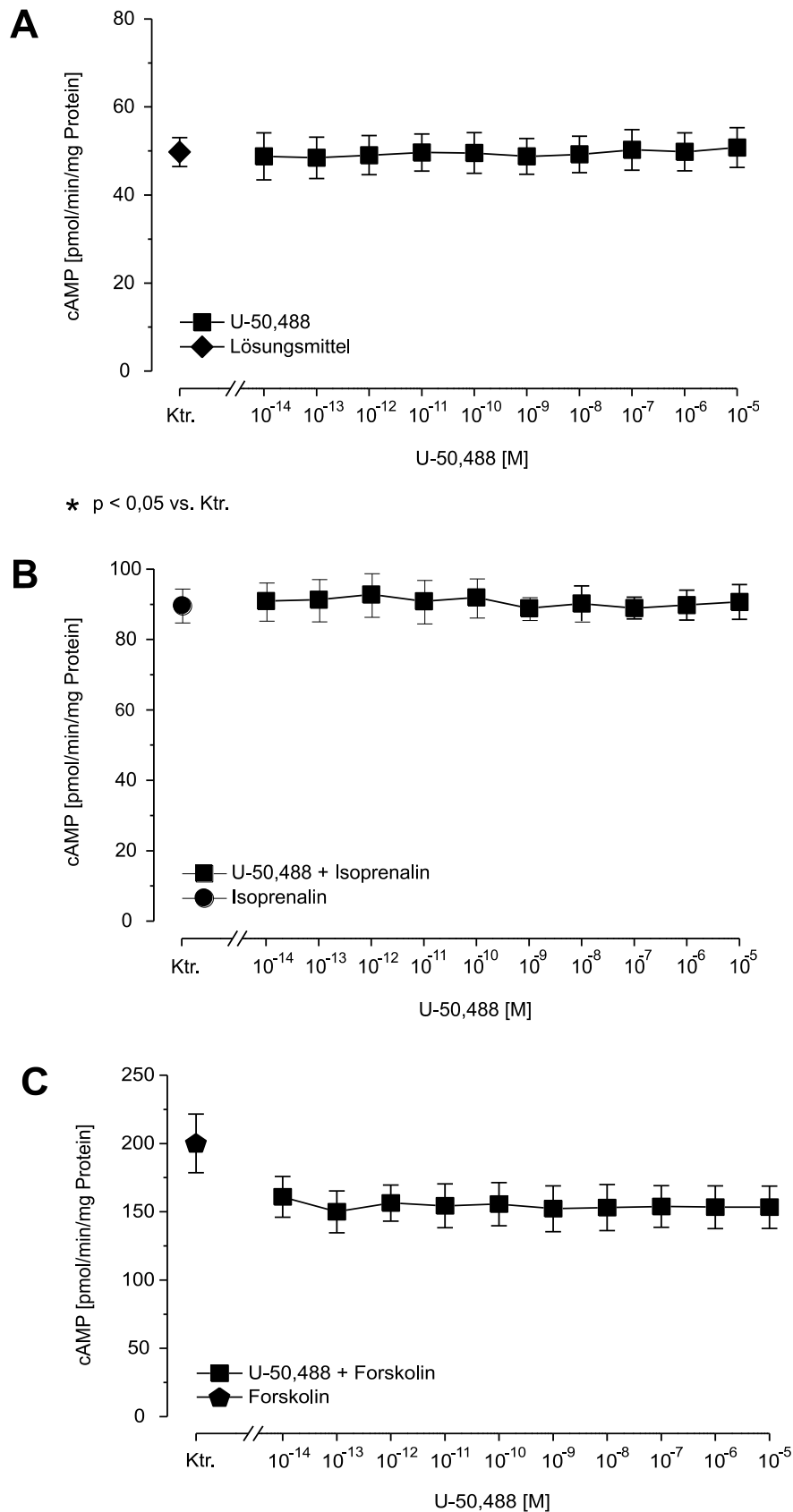


**Abb. 4:** Konzentrationsabhängige Hemmung der cAMP-Bildung durch Carbachol in zuvor gefrorenen Membranpräparationen in **(A)** Lösungsmittel ( $n = 5$ ), **(B)** bei Vorstimulation mit Isoprenalin ( $10 \mu\text{M}$ ,  $n = 4$ ) und **(C)** mit Forskolin ( $10 \mu\text{M}$ ,  $n = 5$ ). Für die Kontrollen wurde Lösungsmittel (**A**), Isoprenalin ( $10 \mu\text{M}$ , **B**) und Forskolin ( $10 \mu\text{M}$ , **C**) verwendet. Inkubationszeit 20 min. ★  $p < 0,05$  vs. Ktr.

Die Messungen der AC-Aktivität unter den Wirkungen von Isoprenalin, Forskolin und Carbachol zeigen Effekte, die auch von anderen Arbeitsgruppen gemessen wurden (Sulakhe et al. 1985, Watson et al. 1988). Wir gehen deshalb davon aus, dass bei der Durchführung der Membranpräparation der Komplex aus membranständigem Rezeptor, regulierenden G-Proteinen und Enzym intakt geblieben ist. Auffallend in der Messreihe mit Carbachol unter Forskolinstimulation (siehe Abb. 4 C) war, dass die Menge an gebildetem cAMP unter Forskolinwirkung, die als Kontrolle gemessen wurde, nicht erreicht werden konnte. Dies war auch unter Verwendung sehr niedriger Carbacholkonzentrationen (bis max.  $10^{-13}$  M) nicht möglich. Um auszuschließen, dass dies präparationsbedingt ist, wurden, wie bereits eingangs erwähnt, die Messungen mit Membranpräparationen wiederholt, die zu Lagerungszwecken nicht gefroren wurden, sondern direkt im AC-Assay eingesetzt wurden (siehe hierzu Abschnitt 3.2).

#### 3.1.5 Konzentrationsabhängige Wirkung von U-50,488 auf die basale cAMP-Bildung, bei Vorstimulation mit Isoprenalin (10 $\mu$ M) oder Forskolin (10 $\mu$ M)

Im Gegensatz zu Carbachol hat der selektive  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonist U-50,488 keinen Einfluss auf die basale, Isoprenalin-stimulierte oder Forskolin-stimulierte cAMP-Bildung durch die AC in Membranpräparationen aus ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte. Wie Abbildung 5 A zeigt, liegt die basale cAMP-Bildung bei  $49,7 \pm 3,3$  pmol/min/mg Protein, in Anwesenheit des selektiven  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonisten U-50,488 (10  $\mu$ M) bei  $50,8 \pm 4,5$  pmol/min/mg Protein. Die basale cAMP-Bildung wird durch U-50,488 auch bei einer Konzentration von 10 mikromolar nicht beeinflusst. Abbildung 5 B zeigt, dass die Isoprenalin-stimulierte cAMP-Bildung, die hier bei  $89,8 \pm 4,8$  pmol/min/mg Protein liegt, in Anwesenheit von U-50,488 (10  $\mu$ M) ebenfalls nicht beeinflusst wird. Sie beträgt  $90,7 \pm 5,0$  pmol/min/mg Protein. Auffällig war, dass die Forskolin-stimulierte cAMP-Bildung, die mit  $274 \pm 12$  pmol/min/mg Protein gemessen wurde, in Anwesenheit verschiedener U-50,488 - Konzentrationen konstant erniedrigt ist. Auch hier zeigt sich kein konzentrationsabhängiger Effekt. (Abb. 5C) Die cAMP-Bildung liegt zwischen  $253 \pm 22$  pmol/min/mg Protein (U-50,488 10  $\mu$ M) und  $261 \pm 23$  pmol/min/mg Protein (U-50,488  $10^{-14}$ M). Die Ursache für diese konstante Reduzierung der cAMP-Bildung, die bereits auch bei der Messung mit Carbachol



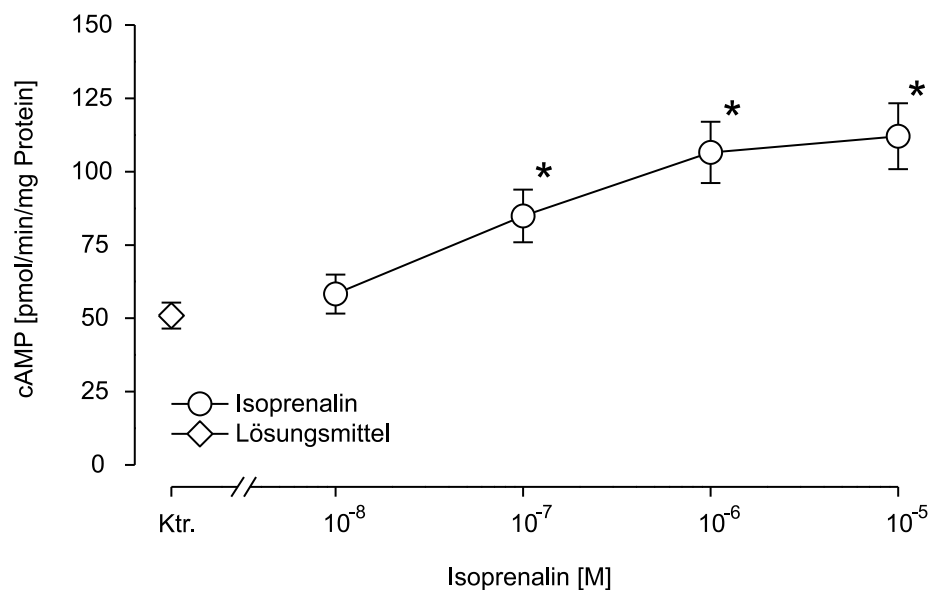
**Abb.5:** Konzentrationsabhängige Wirkung des selektiven  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonisten U-50, 488 in **(A)** Lösungsmittel (n = 6), **(B)** bei Vorstimulation mit Isoprenalin (10  $\mu$ M, n = 4) oder **(C)** mit Forskolin (1  $\mu$ M, n = 5) auf die cAMP-Bildung in gefrorenen Membranpräparationen. Für die Kontrollen wurde Lösungsmittel **(A)**, Isoprenalin (10  $\mu$ M, **B**) und Forskolin (10  $\mu$ M, **C**) verwendet. Inkubationszeit 20 min.

unter Forskolin beobachtet wurde, ist nicht bekannt. Auch diese Versuchsreihe wurde deshalb mit frischen Membranpräparationen wiederholt.

### 3.2 cAMP-Bildung durch die Adenylylcyclase in frischen Membranpräparationen aus ventrikulären Kardiomyozyten

#### 3.2.1 Konzentrationsabhängige Wirkung von Isoprenalin auf die cAMP-Bildung

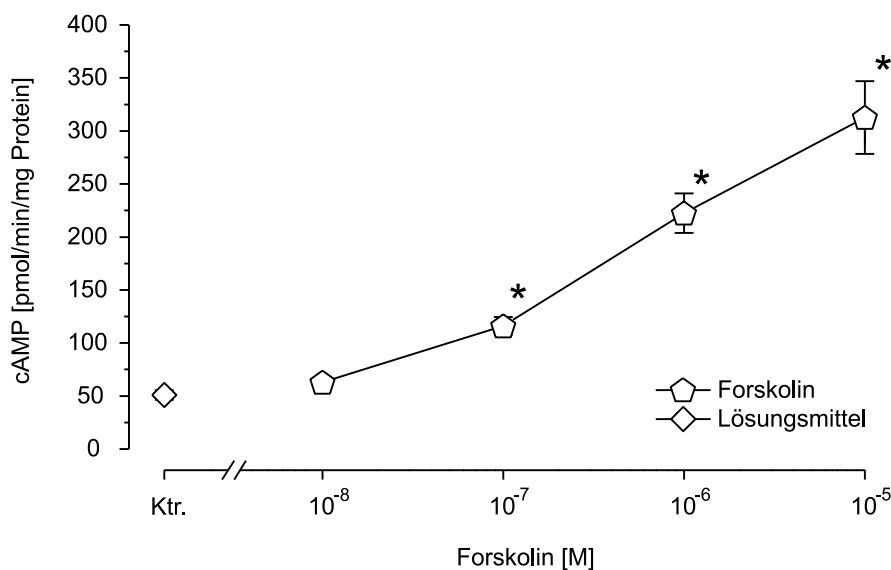
Die basale cAMP-Bildung von  $50,9 \pm 4,4$  pmol/min/mg Protein ist nicht signifikant verändert im Vergleich zur basalen cAMP-Bildung in gefrorenen Membranpräparationen. Sie steigt konzentrationsabhängig unter Isoprenalinstimulation auf maximal  $112 \pm 11$  pmol/min/mg Protein bei einer Isoprenalinkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  (Abb.6). Das entspricht einer Erhöhung um den Faktor 2. Auch diese Steigerung ist nicht signifikant unterschiedlich zum Ergebnis mit zuvor gefrorenen Membranpräparationen.



**Abb. 6:** Konzentrationsabhängige Wirkung von Isoprenalin auf die cAMP-Bildung in frischen Membranpräparationen (n = 5). Ktr. entspricht der Aktivität der AC in Lösungsmittel. Inkubationszeit 20 min. ★ p < 0,05 vs. Ktr.

### 3.2.2 Konzentrationsabhängige Wirkung von Forskolin auf die cAMP-Bildung

Die basale cAMP-Bildung durch die AC von  $50,9 \pm 4,4$  pmol/min/mg Protein steigt konzentrationsabhängig unter Forskolinstimulation auf maximal  $313 \pm 34$  pmol/min/mg Protein bei einer Forskolinkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  (Abb. 7). Das entspricht einer Erhöhung um den Faktor 6. Diese Ergebnisse unterscheiden sich nicht von den Ergebnissen, die zuvor mit den gefrorenen Membranen erhoben wurden.



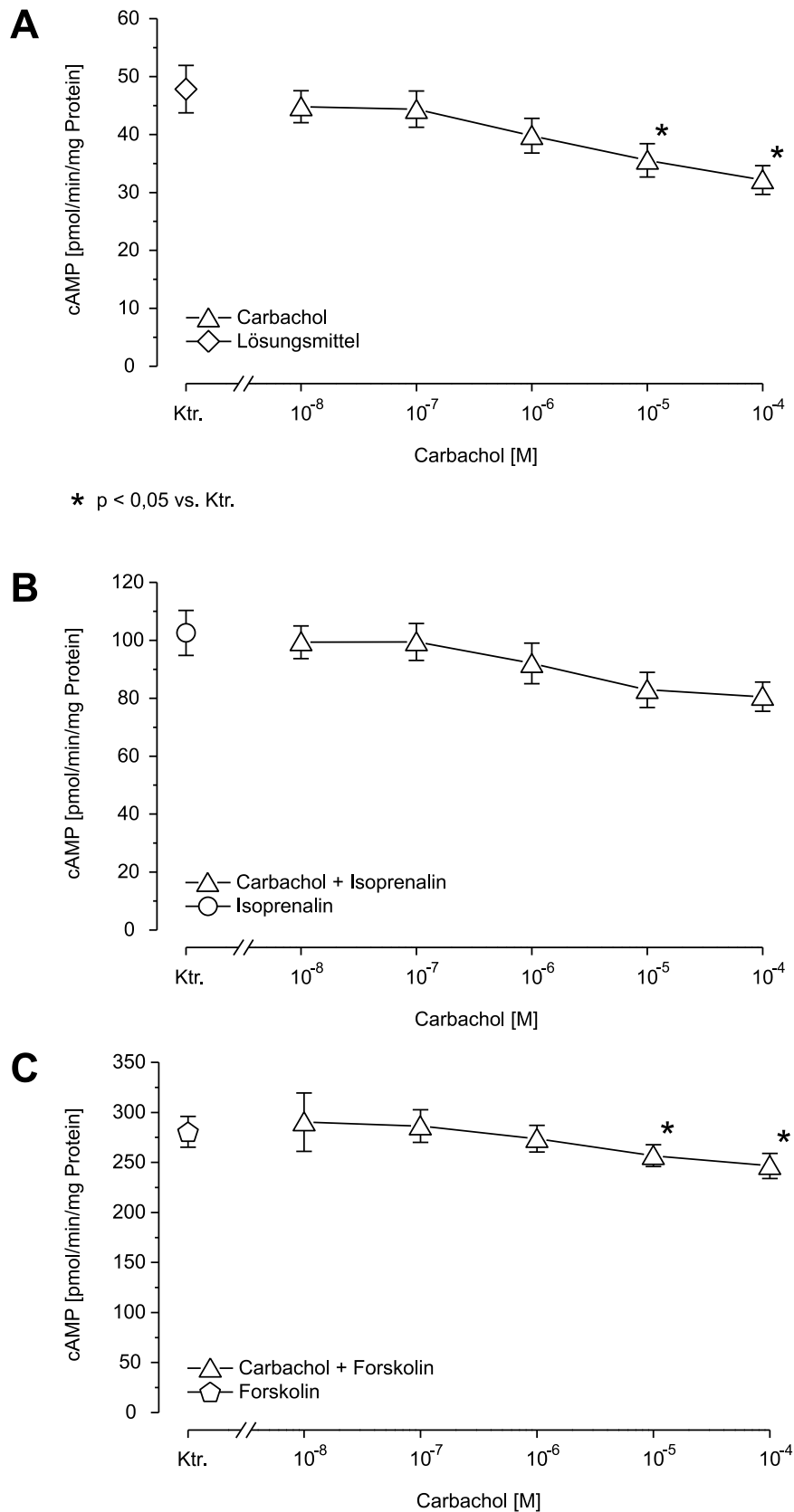
**Abb. 7:** Konzentrationsabhängige Wirkung von Forskolin auf die cAMP-Bildung in frischen Membranpräparationen ( $n = 5$ ). Kontrolle (Ktr.) entspricht der Aktivität der AC in Lösungsmittel. Inkubationszeit 20 min. ★  $p < 0,05$  vs. Ktr.

### 3.2.3 Konzentrationsabhängige Hemmung der basalen cAMP-Bildung durch Carbachol, bei Vorstimulation mit Isoprenalin ( $10 \mu\text{M}$ ) oder Forskolin ( $10 \mu\text{M}$ )

Die basale cAMP-Bildung beträgt  $47,8 \pm 4,1$  pmol/min/mg Protein (Abb. 8A). Diese Enzymaktivität lässt sich unter Carbachol konzentrationsabhängig auf  $32,2 \pm 2,5$  pmol/min/mg Protein ( $100 \mu\text{M}$  Carbachol) reduzieren (Abb. 8A).

Ebenso wird die durch Isoprenalin ( $10 \mu\text{M}$ ) stimulierte cAMP-Bildung von  $103 \pm 7,7$  pmol/min/mg Protein durch Carbachol ( $100 \mu\text{M}$ ) auf  $80,5 \pm 5,0$  pmol/min/mg Protein gehemmt (Abb. 8B), wobei diese Hemmung jedoch nicht signifikant war. Die durch Forskolin ( $10 \mu\text{M}$ ) stimulierte cAMP-Bildung betrug  $281 \pm 15$  pmol/min/mg Protein,





**Abb. 8:** Konzentrationsabhängige Hemmung der cAMP-Bildung durch Carbachol in frischen Membranpräparationen in **(A)** Lösungsmittel (n = 4), **(B)** unter Isoprenalin (10  $\mu$ M, n = 4) und **(C)** unter Forskolin (10  $\mu$ M, n = 4). Für die Kontrollen wurde Lösungsmittel **(A)**, Isoprenalin (10  $\mu$ M, **B**) und Forskolin (10  $\mu$ M, **C**) verwendet. Inkubationszeit 20 min. ★ p < 0,05 vs. Ktr.

unter Carbacholwirkung nimmt die cAMP-Bildung (100  $\mu$ M) auf  $247 \pm 13$  pmol/min/mg Protein ab (Abb. 8C). Die Versuche mit Carbachol an frischen Membranpräparationen zeigen zu den Ergebnissen an gefrorenen Membranpräparationen keinen signifikanten Unterschied.

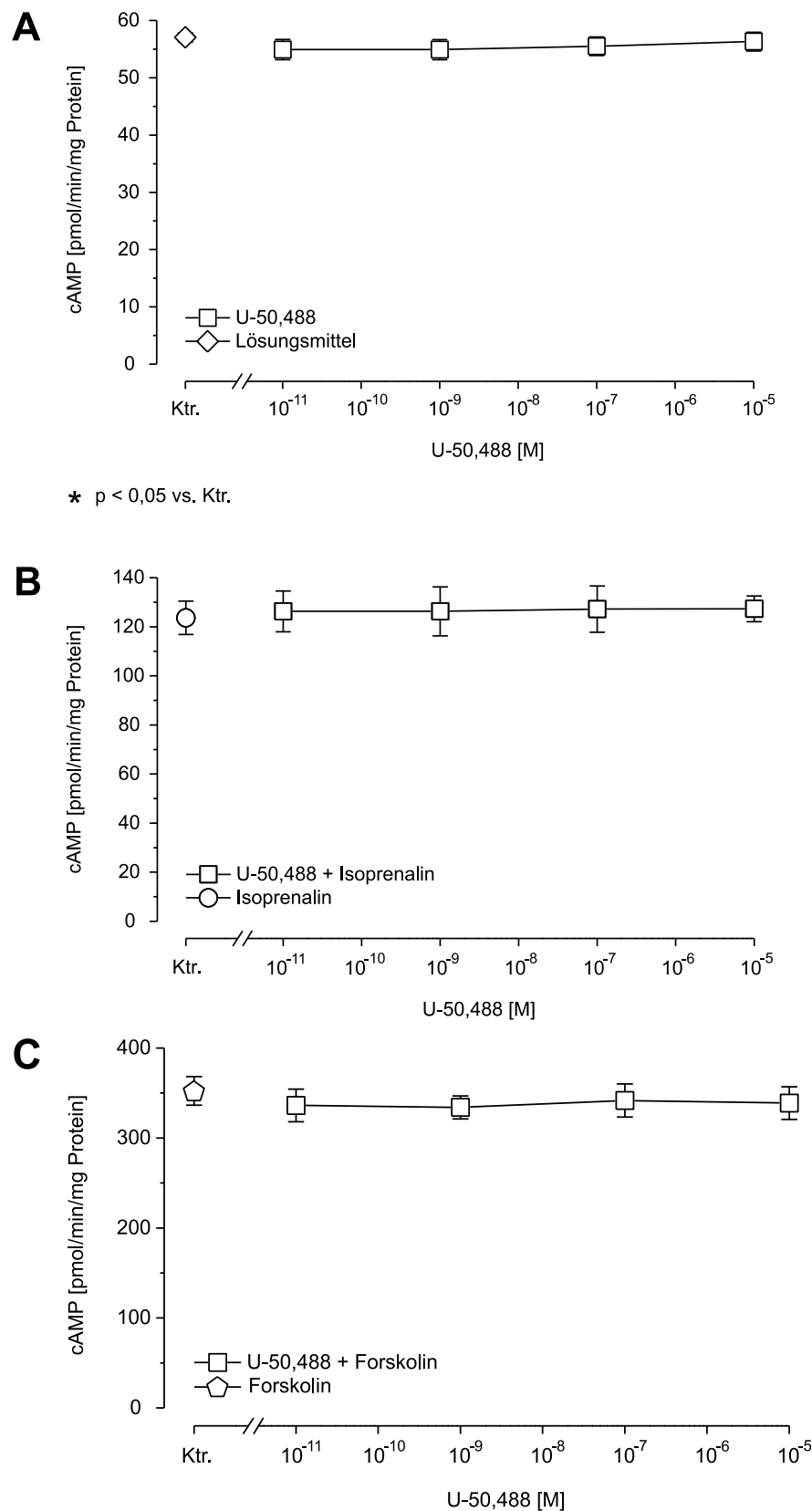
#### 3.2.4 Konzentrationsabhängige Wirkung von U50,488 auf die basale cAMP-Bildung, bei Vorstimulation mit Isoprenalin (10 $\mu$ M) oder Forskolin (10 $\mu$ M)

In Abb. 9 A beträgt die basale cAMP-Bildung durch die AC  $57,0 \pm 0,8$  pmol/min/mg Protein, unter U-50,488 (10  $\mu$ M)  $56,3 \pm 1,6$  pmol/min/mg Protein. Es kommt zu keiner Abnahme der gebildeten cAMP-Menge.

In Abb. 9 B wurde unter Stimulation mit Isoprenalin (10  $\mu$ M) eine cAMP-Menge von  $123,6 \pm 6,8$  pmol/min/mg Protein gemessen, unter U-50,488 (10  $\mu$ M) liegt mit  $127,3 \pm 5,3$  pmol/min/mg Protein ebenso keine Änderung der Enzymaktivität vor. Auch die durch Forskolin (10  $\mu$ M) stimulierte Enzymaktivität von  $352 \pm 16$  pmol/min/mg Protein ändert sich unter U-50,488 (10  $\mu$ M) nicht signifikant. Sie betrug  $339 \pm 18$  pmol/min/mg Protein (Abb. 9 C). Es zeigt sich somit auch in der Versuchsreihe mit U-50,488 an frischen Membranpräparationen kein signifikanter Unterschied zu den entsprechenden Messungen an zuvor gefrorenen Membranpräparationen.

Die bei den gefrorenen Membranpräparationen beobachtete Differenz zwischen AC-Aktivität unter hochverdünntem Carbachol bei gleichzeitiger Forskolinwirkung und AC-Aktivität bei alleiniger Forskolinwirkung trat nicht mehr auf. Ebenso war die AC-Aktivität unter U-50,488 bei Forskolinstimulation der reinen Forskolin-stimulierten Aktivität der AC nicht signifikant unterschiedlich.

Die Reduktion der kontraktilen Antwort in isolierten, elektrisch stimulierten ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte unter dem selektiven  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonisten U-50,488 kann nicht über eine direkte Interaktion zwischen AC und dem  $\kappa$ -Opioidrezeptor mittels inhibitorischer G-Proteine erklärt werden.



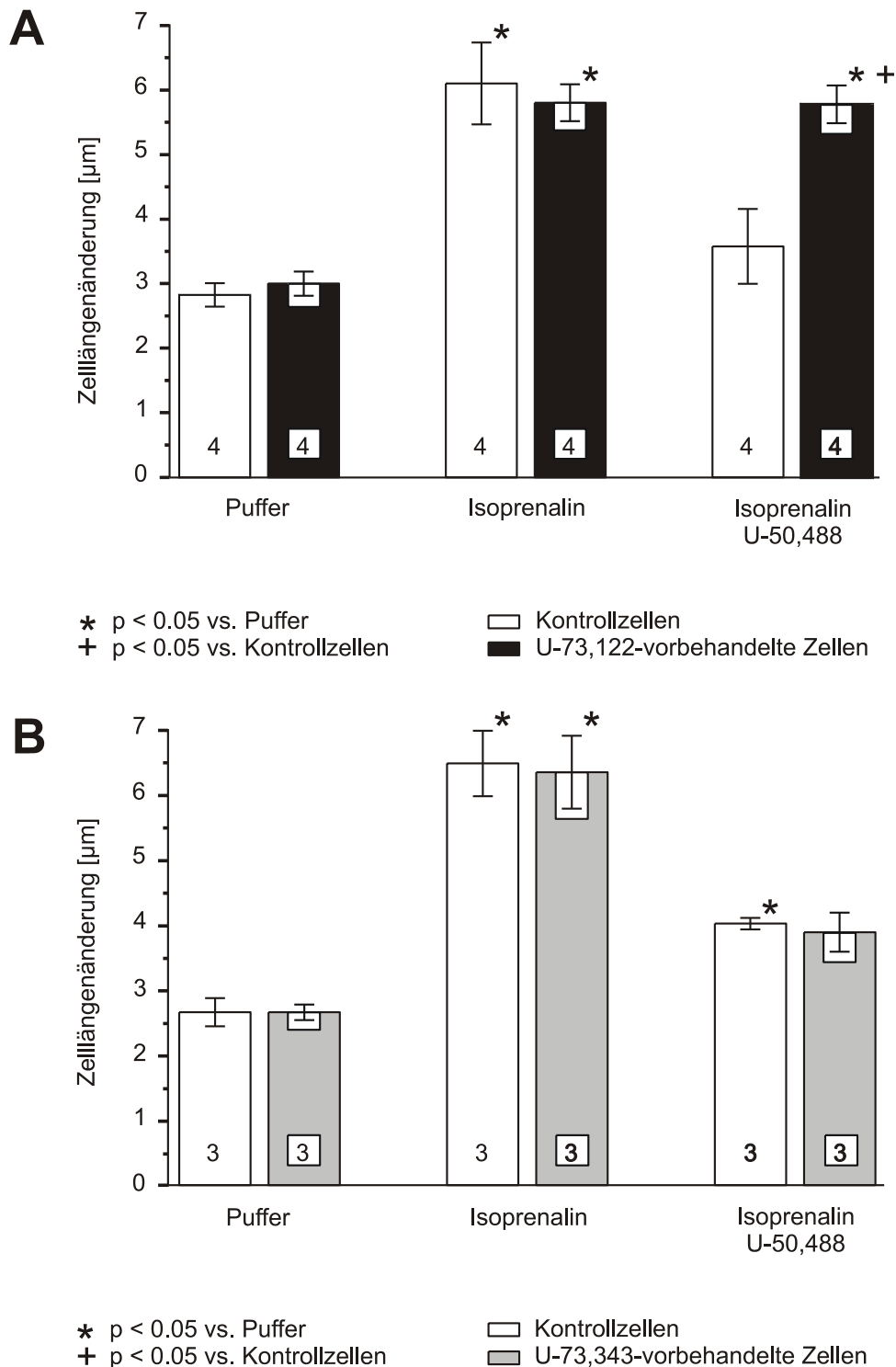
**Abb. 9:** Konzentrationsabhängige Wirkung von U-50,488 in (A) Lösungsmittel ( $n = 3$ ), (B) bei Vorstimulation mit Isoprenalin ( $10 \mu\text{M}$ ,  $n = 3$ ) und (C) mit Forskolin ( $10 \mu\text{M}$ ,  $n = 3$ ) auf die Aktivität der AC in frischen Membranpräparationen. Für die Kontrollen wurde (A) Lösungsmittel, (B) Isoprenalin ( $10 \mu\text{M}$ ) und (C) Forskolin ( $10 \mu\text{M}$ ) verwendet. Inkubationszeit 20 min.

### 3.3 Messung der Zelllängenänderung isolierter, elektrisch stimulierter Kardiomyozyten: Einfluss des Phospholipase C-Inhibitors U-73,122 und des Proteinkinase C-Inhibitors Chelerythrin auf die Zelllängenänderung in Anwesenheit von Isoprenalin und Isoprenalin mit U-50,488

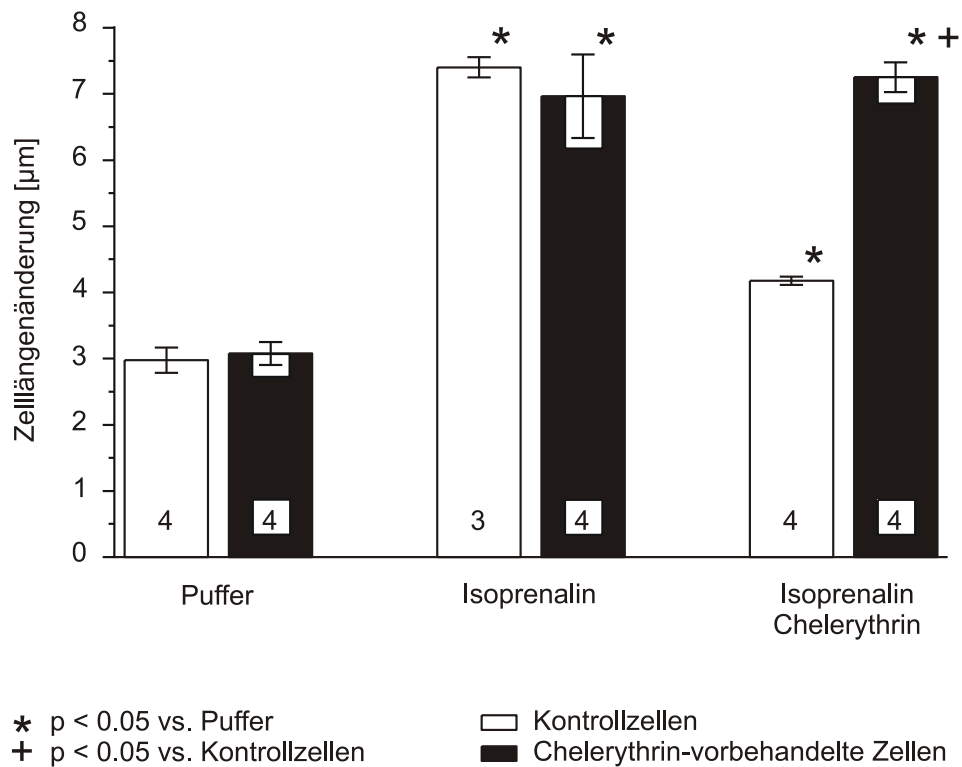
Da der Effekt von U-50,488 auf die Kontraktionsamplitude in isolierten, elektrisch stimulierten ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte nicht über eine direkte Wirkung auf die Aktivität der AC vermittelt wird, wurden in Kontraktionsmessungen weitere Signaltransduktionswege überprüft.

Ventura et al. (1991) zeigten eine  $\kappa$ -Opioidrezeptor-vermittelte Erhöhung des Inositol-1,4,5-triphosphat ( $IP_3$ )-spiegels über eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC).  $IP_3$  bindet an einen Kalziumkanal des endoplasmatischen Retikulums und führt so zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels. Dies bewirkt eine Änderung der Kontraktionsfähigkeit des Myozyten. Die Kardiomyozyten wurden mit dem PLC-Inhibitor U-73,122 für 30 min vorbehandelt. Danach zeigte sich keine Änderung der basalen und Isoprenalin-stimulierten Zelllängenänderung. Wurde jedoch der  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonist U-50,488 in einer Konzentration von 10  $\mu$ M appliziert, kam es nicht mehr zur Reduktion der Kontraktionsamplitude Isoprenalin-stimulierter Kardiomyozyten (Abb. 10 A). Als Kontrolle wurden die Messungen mit U-73,343, einem inaktiven Strukturanalogon des PLC-Inhibitors U-73,122, durchgeführt. Hierunter war die Kontraktionsamplitude der Isoprenalin-stimulierten Kardiomyozyten durch den selektiven  $\kappa$ -Opioidrezeptor-agonisten U-50,488 reduziert (Abb. 10 B). Die Vermittlung dieses Effektes erfolgt über die PLC.

Unter der Aktivierung der PLC entsteht nicht nur  $IP_3$  sondern auch Diacylglycerol (DAG), das die Proteinkinase C (PKC) aktiviert (Nishizuka 1992). Eine Beteiligung der PKC ist deshalb zu vermuten und war von Bian et al. (1998b, 2000) beschrieben worden. Die Aktivierung der PKC führt über die Phosphodiesterase IV in Kardiomyozyten der Rate zu einer Änderung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Die Kardiomyozyten wurden deshalb für 60 min mit Chelerythrin, einem PKC-Inhibitor, vorbehandelt. Anschließend zeigte sich keine Änderung der basalen und Isoprenalin-stimulierten Zelllängenänderung (Abb. 11). Nach Applikation des  $\kappa$ -Opioidrezeptor-agonisten U-50,488 in einer Konzentration von 10  $\mu$ M, kam es nicht mehr zur Reduktion der Kontraktionsamplitude der Isoprenalin-stimulierten Kardiomyozyten (Abb. 11).



**Abb. 10:** Wirkung (A) des PLC-Inhibitors U-73,122 (10 µM, 30 min) und (B) des inaktiven Strukturanalogon U-73,343 (10 µM, 30 min) auf die Effekte von Isoprenalin (5 nM) und Isoprenalin mit U-50,488 (Iso/U-50,488, 5 nM/10 µM) auf die kontraktile Antwort (Änderung der Zelllänge in µm) in isolierten, elektrisch stimulierten (1 Hz), ventrikulären Rattenkardiomyozyten. Die Zahlen in den Säulen markieren die Zahl der Rattenherzen. Mittlere diastolische Zelllänge unter Basalbedingungen (t = 0) in A:  $129 \pm 2$  µm, in B:  $128 \pm 3$  µm.



**Abb. 11:** Einfluss einer Chelerythrin-Vorbehandlung (10  $\mu$ M, 60 min) auf die Wirkung von Isoprenalin (5 nM) und Isoprenalin mit U-50,488 (Iso/U-50,488, 5 nM/10  $\mu$ M) auf die kontraktile Antwort (Änderung der Zelllänge in  $\mu$ m) in isolierten, elektrisch stimulierten (1 Hz), ventrikulären Rattenkardiomyozyten. Die Zahlen in den Säulen markieren die Zahl der verwendeten Rattenherzen. Mittlere diastolische Zelllänge unter Basalbedingungen ( $t = 0$ ):  $141 \pm 2 \mu$ m.

## 4 Diskussion

Verschiedene Arbeiten untersuchten die Effekte von  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Stimulation durch den Agonisten U-50,488 in Kardiomyozyten (Ventura et al. 1992, Sheng et al. 1997, Wenzlaff et al. 1998, Bian et al. 2000) und zeigten eine Reduktion der Kontraktionsamplitude. Diese korreliert direkt mit dem elektrisch induzierten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten (Tatsukawa et al. 1993). Die Reduktion des elektrisch induzierten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten erfolgt über eine Entleerung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichers im sarkoplasmatischen Retikulum. Damit ist die Verfügbarkeit von intrazellulär gespeichertem  $\text{Ca}^{2+}$ , das als Antwort auf elektrische Stimulation freigesetzt werden kann, reduziert (Ventura et al. 1992). Verschiedene intrazelluläre Mechanismen können diesen Effekt vermitteln.

Opioide beeinflussen den intrazellulären cAMP-Spiegel (Lee und Wong 1987, Yamanda et al. 1991), modulieren Kalziumströme (Xiao et al. 1993), aktivieren die Phospholipase C (PLC) (Sheng et al. 1997, Bian et al. 1998a) und die Proteinkinase C (PKC) (Ventura et al. 1991a, Bian et al. 1998b). Auch eine direkte Beeinflussung der Aktivität der Adenylylcyclase (AC) ist beschrieben worden (Niroomand et al. 1996). Ob die Reduktion der Kontraktionsamplitude durch U-50,488 über eine Interaktion des  $\kappa$ -Opioidrezeptor mit der AC vermittelt wird, ist die zentrale Frage dieser Arbeit.

Zur Regulation der Herz-Kreislauffunktion sind unter anderen drei Signalkaskaden genau bekannt. Neben dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) für die Blutdruckregulation und dem atrialen natriuretischen Peptid (ANP), über das das zirkulierende Blutvolumen moduliert werden kann, erfolgt über den  $\beta_1$ -Adrenozeptor die Modulation von Herzfrequenz, Erregungsleitung und Kontraktionsfähigkeit des Myozyten. Bei Stimulation des  $\beta_1$ -Adrenozeptor im Herzen erfolgt über ein  $G_s$ -Protein die Aktivierung der AC. cAMP wird gebildet und aktiviert die Proteinkinase A. Diese moduliert membranäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und es resultiert ein erhöhter extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle. Dadurch kommt es zur Freisetzung von intrazellulär gespeichertem  $\text{Ca}^{2+}$ . Zusätzlich bindet cAMP an HCN-Kanäle (hyperpolarisation activated cyclic nucleotid gate) und führt so zu einer schnelleren Depolarisation des Myozyten (Wahl-Schott et al. 2009).

Zunächst erfolgte durch Isoprenalin in den Membranpräparationen von Kardiomyozyten die Stimulation des  $\beta_1$ -Adrenozeptor. Über ein  $G_s$ -Protein wird die

basale AC-Aktivität auf 199% in gefrorenen und auf 220% in frischen Membranpräparationen gesteigert. Mit Forskolin, das die AC über Interaktion mit ihrer katalytischen Untereinheit direkt stimuliert (Seamon et al. 1981, Daly 1984), wurde die basale AC-Aktivität auf 551% in gefrorenen und auf 614% in den frischen Membranpräparationen gesteigert. Diese Effekte zeigte Sulakhe et al. (1985) sowohl an Kardiomyozyten der Ratte als auch des Schweins. Watson et al. (1988) erhob vergleichbare Daten an Kardiomyozyten des Hasen.

Der Wirkung der  $\beta_1$ -Adrenozeptor-Aktivierung am Herzen steht der Effekt durch Aktivierung des muskarinischen Acetylcholinrezeptor-Subtyps  $M_2$  gegenüber. Acetylcholin vermittelt über diesen Rezeptor negative Dromotropie, Chronotropie und Inotropie. Carbachol ist ein Struktur analogon dieses Neurotransmitters, ist aber gegenüber der Acetylcholinesterase stabiler und hat deshalb eine längere Halbwertszeit. Carbachol hemmt konzentrationsabhängig über ein  $G_{i/o}$ -Protein die AC-Aktivität in gefrorenen Membranpräparationen auf 71%, und in den frisch verwendeten Membranen auf 67%. Auch unter Isoprenalin- und Forskolinstimulation der AC war dieser Effekt nachweisbar. Die Aktivität der AC wurde unter Isoprenalinstimulation durch Carbachol auf 79% (ebenfalls 79% in den frischen Präparationen) und unter Forskolinstimulation auf 68% (89% in frischen Membranpräparationen) reduziert (Sulakhe et al. 1985, Watson et al. 1988). Wir konnten so zeigen, dass in den verwendeten Membranpräparationen von Kardiomyozyten der Ratte der Komplex aus membranständigem Rezeptor, regulatorischen G-Proteinen und AC intakt ist.

Eine Kopplung der  $\kappa$ -Opioidrezeptoren über ein  $G_{i/o}$ -Protein an die AC wurde in Zellen des ZNS und in CHO(Chinese Hamster Ovary)-Zellen, die den  $\kappa$ -Opioidrezeptor exprimieren (Childers et al. 1993, Minami und Satoh 1995) bereits beschrieben. Deshalb wurde nun der  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonist U-50,488 in seiner Wirkung auf die Aktivität der AC untersucht. Hierbei zeigte sich keine signifikante Änderung der basalen, der Isoprenalin- oder der Forskolin-stimulierten AC-Aktivität in gefrorenen und frischen Membranpräparationen. Die von Wenzlaff et al. (1998) beschriebene Verminderung der Zellverkürzung in elektrisch stimulierten Kardiomyozyten der Ratte durch den  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonisten U-50,488 wird also nicht über eine direkte Interaktion der  $\kappa$ -Opioidrezeptoren mit der Adenylylcyclase vermittelt.



Da eine Verringerung der Kontraktionsamplitude durch den  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonisten U-50,488 über eine Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher generiert sein könnte, ist eine Stimulation der PLC durch den  $\kappa$ -Opioidrezeptor zu vermuten (Ventura et al. 1992). Eine Mitbeteiligung des PLC/IP<sub>3</sub>-Second-Messenger-Systems an dieser Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher wurde am Herzen auch von Sheng et al. (1997) und Zhang und Wong (1998) beschrieben. In NG108-15 Zellen (Jin et al. 1994), glatten Muskelzellen (Murthy and Makhoul, 1996) und Gliomazellen (Bohn et al. 2000) führt die Stimulation eines Opioidrezeptors über ein G<sub>i/o</sub>-Protein zu einer Aktivierung der PLC. Wir führten deshalb in isolierten, elektrisch stimulierten Kardiomyozyten der Ratte Kontraktilitätsmessungen mit dem PLC-Inhibitor U-73,122 durch. Dieser PLC-Inhibitor reduzierte die durch den  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonisten U-50,488 hervorgerufene Minderung der Zelllängenverkürzung. Das inaktive Isomer U-73,343 des PLC-Inhibitors U-73,122 zeigte keine Wirkung. Aus diesen Meßergebnissen kann geschlossen werden, dass die Wirkung des  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonisten U-50,488 über die PLC vermittelt wird.

Neben der direkten Hemmung der PLC werden für PLC-Inhibitor U-73,122 weitere PLC-unabhängige Effekte beschrieben. Mogami et al. (1997) und Muto et al. (1997) zeigen eine direkte Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher durch U-73,122. Mogami et al. (1997) misst zusätzlich eine Verstärkung der IP<sub>3</sub> –vermittelten Kalziumfreisetzung und Wang (1996) zeigt einen direkten Einfluss auf membranäre Kalziumkanäle. Einen PLC-unabhängigen Effekt des U-73,122 auf die Zelllängenänderung von Kardiomyozyten der Ratte messen wir nicht. Die mit U-73,122 vorbehandelten Myozyten zeigen in Puffer die gleiche Zelllängenänderung wie die nicht vorbehandelten Myozyten. Auch wenn diese mit Isoprenalin stimuliert wurden, änderte sich die Zelllängenänderung nach Vorbehandlung mit U-73,122 gegenüber den unbehandelten Zellen nicht. Diese Ergebnisse bestätigen die Messungen von Zhang und Wong (1998).

Nach Aktivierung der Phospholipase C kann über Diacylglycerol die Proteinkinase C stimuliert werden (Nishizuka 1992), die über die Phosphodiesterase IV den intrazellulären cAMP-Spiegel beeinflusst (Bian et al. 2000). Weiterhin wurde von Bian et al. (1998) gezeigt, dass die PKC Kalziumkanäle des sarkoplasmatischen Retikulums direkt beeinflussen kann. Ventura et al. (1991) zeigten an Kardiomyozyten der Ratte eine Aktivierung der PKC durch  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonisten U-50,488 und eine Aufhebung dieses Effektes durch den PKC-Antagonisten

Staurosporin. Wir testeten deshalb den PKC-Inhibitor Chelerythrin und konnten so den inhibitorischen Effekt des  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonisten U-50,488 auf die kontraktile Antwort ebenfalls aufheben. Sowohl die Aktivierung der PKC als auch die Aktivierung des PLC-IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>-Pfades durch den  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonisten U-50,488 in Kardiomyozyten sind über eine Modulation der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase an der Reduktion der Kontraktionsamplitude beteiligt.

Die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Homöostase ist ein zentraler Faktor bei der Entstehung von Erkrankungen des Herzens (Houser et al. 2000, Hasenfuss et al. 2002). Man unterscheidet hier drei Kategorien, wobei eine die Erkrankungen umfasst, die primär auf eine Pathologie im Bereich des Herzmuskels zurückgehen, wie zum Beispiel die idiopathische dilatative Kardiomyopathie oder die Postinfarkt-Myopathie. Davon abzugrenzen sind die linksventrikuläre Dysfunktion durch Klappenfehler oder arterielle Hypertonie und die koronare Herzerkrankung. Bezüglich der Wirkung der  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Stimulation sind die Kardiomyopathien am besten untersucht.

Eine Veränderung der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase ist assoziiert mit dem Auftreten von Arrhythmien. Bei der Herzinsuffizienz ist u.a. die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum reduziert. Durch den so veränderten Ca<sup>2+</sup>-Transienten erfolgt keine vollständige Aktivierung der Myofilamente mehr. Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie und Patienten mit Postinfarkt-Kardiomyopathie zeigen dagegen eine reduzierte Ca<sup>2+</sup>-ATPase-Aktivität des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA), eine reduzierte Ca<sup>2+</sup>-Wiederaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum und darüber eine verzögerte Relaxation (Flesch et al. 1996, Sen et al. 2000). Die Rolle der  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Stimulation wurde in verschiedensten Modellen untersucht. McCloskey et al. (2007) verwendeten ein Modell mit transgenen Mäusen, die den G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelten Ro<sub>1</sub>-Rezeptor exprimieren, der funktionell und strukturell dem humanen  $\kappa$ -Opioidrezeptor ähnelt. Die Mäuse entwickeln nach 16 Wochen eine letale dilatative Kardiomyopathie, die bei Behandlung mit dem Ro<sub>1</sub>- und  $\kappa$ -Opioidrezeptorantagonisten nor-Binaltorphimin nicht auftritt.

Initial nach Ro<sub>1</sub>-Expression, bevor es zu einer funktionellen und strukturellen Schädigung im Kardiomyozyten kommt, ist eine Verminderung der SERCA-Aktivität und eine Erhöhung der Matrix-Metalloproteinase 2-Aktivität (MMP-2) zu messen, wobei die Ca<sup>2+</sup>-Homöostase ein bekannter Regulator für die MMP-2-Expression und –Aktivität ist (Kohn et al. 1994). Im weiteren Verlauf kommt es durch die verminderte

SERCA-Aktivität zur einer Änderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und durch die Hochregulation der MMP-2-Aktivität zur strukturellen Schädigung der Myofilamente. Zusätzlich verursacht  $\text{Ro}_1$ -Stimulation mit Spiradolin, einem selektiven  $\text{Ro}_1$ -Rezeptoragonisten, Bradykardie und reduziert den Isoprenalin- und Forskolin-stimulierten cAMP-Spiegel. Diese Effekte werden durch Pertussis-Toxin und nor-Binaltorphimin aufgehoben. Sie sind also G-Protein-gekoppelt und über den  $\text{Ro}_1$ -Rezeptor vermittelt.

Weiterhin wurde bereits von Bian et al. (1998) gezeigt, dass der  $\kappa$ -Opioid-rezeptorantagonist U-50,488 in isolierten, perfundierten Herzen der Ratte Arrhythmien induziert. Dieser arrhythmogene Effekt konnte sowohl durch Naloxon, einen unspezifischen Opioidrezeptorantagonisten, als auch durch nor-Binaltorphimin, einen selektiven  $\kappa$ -Opioidrezeptorantagonisten, aufgehoben werden. Unter dem PLC-Inhibitor U-73,122 trat die Arrhythmie nicht auf, während das inaktive Strukturanalogon U-73,343 keine Wirkung hatte. Die arrhythmogene Wirkung des U-50,488 wird über die PLC vermittelt. Eine Beteiligung der PKC an dieser Wirkung wurde von Ventura et al. (1991) beschrieben. Diese Erkenntnisse werden möglicher Weise Ansatzpunkte für neue Therapien bei Erkrankungen des Myokards liefern.

## 5 Zusammenfassung

Der  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonist U-50,488 vermindert die Amplitude der Kontraktion elektrisch stimulierter, ventrikulärer Kardiomyozyten der Ratte. Auch unter Stimulation  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptoren mit Isoprenalin ist eine Reduktion der kontraktilen Antwort der Zellen zu beobachten (Wenzlaff et al. 1998). Diese Befunde lassen eine Interaktion zwischen  $\beta_1$ -Adrenozeptor und Opioidrezeptor vermuten. Wir untersuchten deshalb die Wirkung von U-50,488 auf die Aktivität der Adenylylcyclase (AC) in Membranpräparationen isolierter Kardiomyozyten der Ratte. Aus den retrograd perfundierten Herzen männlicher Wistar-Ratten wurden Membranpräparationen hergestellt. Diese wurden entweder in flüssigem Stickstoff gefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert oder direkt im AC-Assay eingesetzt. Die AC wurde durch Isoprenalin und Forskolin stimuliert. Die Enzymaktivität stieg unter Isoprenalin auf das Doppelte und unter Forskolin auf das 6fache der Kontrolle. Zum Vergleich wurde die Wirkung des muskarinischen Acetylcholinrezeptoragonisten Carbachol untersucht. Unter Carbacholwirkung sank die AC-Aktivität konzentrationsabhängig auf 67 % bei unstimulierten Membranen, auf 79 % unter Isoprenalinstimulation und auf 82 % unter Forskolinstimulation. Der  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonist U-50,488 hatte keine Wirkung auf die unstimulierte, Isoprenalin-stimulierte oder Forskolin-stimulierte AC-Aktivität. Weiterhin wurden in Kontraktilitätsmessungen ein PLC- und ein PKC-Inhibitor untersucht. Zunächst wurden die Kardiomyozyten mit dem PLC-Inhibitor U-73,122 vorbehandelt. Darunter zeigte sich keine Änderung der basalen und Isoprenalin-stimulierten Zelllängenänderung. Die Reduktion der Zelllängenänderung der Kardiomyozyten durch den  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonist U-50,488 wird jedoch durch den PLC-Inhibitor U-73,122 aufgehoben. Weiterhin wurden die Zellen mit Chelerythrin, einem PKC-Inhibitor, vorbehandelt. Auch dies führte zu einer Aufhebung des U-50,488-Effekts auf die Zelllängenänderung der Kardiomyozyten. Die Reduktion der Kontraktionsamplitude elektrisch stimulierter, isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten der Ratte durch den  $\kappa$ -Opioidrezeptoragonisten U-50,488 wird nicht über eine Adenylylcyclase vermittelt, sondern über einen Phospholipase C- und Proteinkinase C-abhängigen Signaltransduktionsweg.

## Summary

The  $\kappa$ -opioid receptor (OPR) agonist U-50,488 reduces the contraction amplitude in isolated, electrically driven rat ventricular cardiomyocytes. In addition, a reduction of the contraction amplitude can also be seen in the presence of isoprenaline (Wentzlaff et al., 1998), a stimulator of  $\beta$ -adrenergic receptors. These observations lead to the hypothesis of an interaction between adrenoceptor and opioid receptor. Therefore we examined the effect of U-50,488 on the activity of adenylyl cyclase in crude membrane preparation from rat heart cells. Crude membrane preparations were performed from isolated, retrograde perfused hearts of male Wistar rats. Membranes were either snap frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  or directly used for the adenylyl cyclase assay. Adenylyl cyclase activity was stimulated using either isoprenaline or forskolin. Enzyme activity was 2-fold increased in the presence of isoprenaline and 6-fold in the presence of forskolin compared to baseline activity. In comparison, the effect of the muscarinic acetylcholine receptor agonist carbachol on crude membrane preparations was investigated. Baseline activity was reduced in a dose dependent manner in the presence of carbachol to 67% in non-stimulated membranes, to 79% in membranes stimulated by isoprenaline and to 82% in membranes stimulated by forskolin. U-50,488 showed no effect on adenylyl cyclase activity, neither in non-stimulated membranes nor in membranes stimulated by isoprenaline or forskolin. Furthermore, the effects of the specific inhibitor of phospholipase C, U-73,122 and specific inhibitor of protein kinase C, chelerythrine, on the contraction amplitude were investigated. The decrease in contraction amplitude in the presence of U-50,488 in isoprenaline stimulated heart cells is abolished whereas there is no effect of U-73,122 on the contraction amplitude in non-stimulated or forskolin-stimulated heart cells. In addition, preincubation with chelerythrine abolished the effect of U-50,488 on the contraction amplitude in heart cells, too. The reduction of the contraction amplitude in electrically stimulated isolated ventricular rat cardiomyocytes in the presence of U-50,488 is not mediated via the adenylyl cyclase pathway. The effect seems to be mediated via a phospholipase C and protein kinase C dependent pathway. Further investigations are needed to elaborate the effects of the  $\kappa$ -opioid receptor agonist U-50,488 on the contraction amplitude of rat heart cells.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adler MW, Geller EB, Rosow CE, Cochin J (1988) The opioid system and temperature regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 28: 429-449
- Attali B, Saya D, Vogel Z (1989) Kappa-opiate agonists inhibit adenylate cyclase and produce heterologous desensitization in rat spinal cord. *J Neurochem* 52: 360-369
- Bellet M, Elghozi JL, Meyer P, Pernollet MG, Scmitt H (1989) Central cardiovascular effects of narcotic analgesics and enkephalins in rats. *Br J Pharmacol* 71: 365-369
- Bian JS, Zhang WM, Xia Q, Wong TM (1998a) Phospholipase C inhibitors attenuate arrhythmias induced by  $\kappa$ -receptor stimulation in the isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 30: 2103-2110
- Bian JS, Wang HX, Zhang WM, Wong TM (1998b) Effects of  $\kappa$ -opioid receptor stimulation in the heart and the involvement of protein kinase C. *Br J Pharmacol* 124: 600-606
- Bian JS, Zhang WM, Pei JM, Wong TM (2000) The role of phosphodiesterase in mediating the effect of protein kinase C on cyclic AMP accumulation upon  $\kappa$ -receptor stimulation in the rat heart. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 1065-1070
- Blume AJ (1978a) Interactions of ligands with opiate receptors of brain membranes: regulation by ions and nucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 1713-1717
- Blume AJ (1978b) Opiate binding to membrane preparations of neuroblastoma x glioma hybrid cells NG108-15: effects of ions and nucleotides. *Life Sci* 22: 1843-1852
- Bohn LM, Belcheva MM, Coscia CJ (2000) Mitogenic signalling via endogenous Kappa-opioid receptors in C6 glioma cells: evidence for the involvement of

- protein kinase C and the mitogen-activated protein kinase signalling cascade. J Neurochem 74: 564-573
- Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR (1987) identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. Science 237: 527-532
- Bonner TI, Young AC, Brann MR, Buckley NJ (1988) Cloning and expressing of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. Neuron 1: 403-410
- Brodde OE, Hillemann S, Kunde K, Vogelsang M, Zerkowski HR (1992) Receptor systems affecting force of contraction in the human heart and their alterations in chronic heart failure. J Heart Lung Transplant 11: 164-174
- Brodde OE, Michel MC, Zerkowski HR (1995) Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure. Cardiovasc Res 30: 570-584
- Bunzow JR, Saez C, Mortrud M, Bouvier C, Williams JT, Low M, Grandy DK (1994) Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not  $\mu$ ,  $\delta$  or  $\kappa$  opioid receptor type. FEBS Lett 347: 284-299
- Canossa M, Ventura C, Vaona I, Carboni L, Guarnieri C, Spampinato S (1993) Prodynorphin mRNA expression in adult cultured rat ventricular cardiac myocytes. Biochim Biophys Acta 1172: 247-250
- Chang KJ, Hazum E, Killian A, Cuatrecasas P (1981) Interactions of ligands with morphine and enkephalin receptors are differentially affected by guanine nucleotides. Mol Pharmacol 20: 1-7
- Chavkin C, James IF, Goldstein A (1982) Dynorphin is a specific endogenous ligand of the kappa opioid receptor. Science 215: 413-415

- Childers SR, Snyder SH (1979) Guanine nucleotides differentiate agonist and antagonist interactions with opiate receptors. *Life Sci* 23: 759-762
- Childers SR, Snyder SH (1980) Differential regulation by guanine nucleotide of opiate agonist and antagonist receptor interactions. *J Neurochem* 34: 583-593
- Childers SR (1993) Opioid receptor-coupled second messenger systems. Herz A (ed.) *Opioids I, Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer-Verlag Berlin, Vol 104: 189-216
- Chou WS, Ho AKS, Loh HH (1971) Effect of acute and chronic morphine and norepinephrine on brain adenylate cyclase activity. *Proc West Pharmacol Soc* 14: 42-46
- Clô C, Muscari C, Tantini B, Pignatti C, Bernardi P, Ventura C (1985) Reduced mechanical activity of perfused rat heart following morphine or enkephalin peptides administration. *Life Sci* 37: 1327-1333
- Collier HOJ, Roy AC (1974) Morphine-like drugs inhibit the stimulation by E prostaglandins of cyclic AMP formation by rat brain homogenates. *Nature* 248: 24-27
- Daly MJ, Elz JS, Nayler WG (1984) Sarcolemmal enzymes and  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  exchange in hypoxic, ischemic, and reperfused rat hearts. *Am J Physiol.* 247: H237-243
- Dhawan BN, Cesselin F, Raghbir R, Reisine T, Bradley PB, Potoghese PS, Hamon M (1996) International Union of Pharmacology. XII. Classification for opioid receptors. *Pharmacol Rev* 48: 567-592
- Ehlert FJ, Delen FM, Yun SH, Friedman DJ, Self DW (1989) Coupling of subtypes of the muscarinic receptor to adenylate cyclase in the corpus striatum and heart. *J Pharmacol Exp Ther* 251: 660-671



- Evans CJ, Keith DE, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258: 1952-1955
- Faden AI (1993) Role of endogenous opioids in central cardiovascular regulation and dysregulation. Herz A (ed.), *Opioids II, Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer-Verlag Berlin, Vol 104/II: 191-204
- Flesch M, Schwinger RH, Schnabel P, Schiffer F, van Gelder I, Bavendiek U, Südkamp M, Kuhn-Regnier F, Böhm M (1996) Sarcoplasmatic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and phospholamban mRNA and protein levels in end-stage heart failure due to ischemic or dilated cardiomyopathy. *J Mol Med* 74: 321-332
- Forman LJ, Bagasara O (1992) Demonstration by in situ hybridization of the proopiomelanocortin gene in the rat heart. *Brain Res Bull* 28: 441-445
- Gautret B, Schmitt H (1985) Central and peripheral sites for cardiovascular actions of dynorphin-(1-13) in rats. *Euro J Pharmacol* 111: 263-266
- Goldberg AH, Padget CH (1969) Comparative effects of morphine and fentanyl on isolated heart muscle. *Anesth Analg* 48: 978-982
- Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkpiller M, Hood L (1979) Dynorphin (1-13) - an extraordinary potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 6666-6670
- Gulland JM, Robinson R (1923) The morphine group. Part I. A discussion of the constitutional problem. *J Chem Soc* 123: 980-987
- Hamprecht B (1977) Structural, electrophysiological, biochemical, and pharmacological properties of neuroblastoma x glioma cell hybrids in cell culture. *Int Rev Cytol* 49: 99-170
- Hasenfuss G, Pieske B (2002) Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 34: 951-969

- Herz A, Millan MJ (1988) Endogenous opioid peptides in the descending control of nociceptive responses of spinal dorsal horn neurons. *Prog Brain Res* 77: 263-273
- Höllt V (1993) Regulation of Opioid Peptide Gene Expression. Herz A (ed.), *Opioids II, Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer-Verlag Berlin, Vol 104/II: 307-346
- Holaday JW (1982) Cardiorespiratory effects of  $\mu$  and  $\delta$  opiate agonists following third or fourth ventricular injections. *Peptides* 3: 1023-1029
- Holaday JW (1983) Cardiovascular effects of endogenous opiate systems. *Annu Rev. Pharmacol Toxicol* 23: 541-594
- Holtzhauer M (1979) *Biochemische Labormethoden*. Springer-Verlag, 3. korr. Auflage, 249 Seiten
- Houser SR, Piacentino V 3<sup>RD</sup>, Weisser J (2000) Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 32: 1595-1607
- Howells RD, Kilpatrick DL, Bailey LC, Noe M, Udenfriend S (1986) Proenkephalin mRNA in rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1960-1063
- Hughes J (1975) Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res* 88: 295-308
- Hughes J, Smith T, Kosterlitz H, Fothergill L, Morgan B, Morris H (1975) Identification of two related pentapeptides from brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258: 577-579
- Jin W, Lee NM, Loh MM, Thayer SA (1994) Opioids mobilized calcium from inositol1,4,5-trisphosphate-sensitive stores in NG108-15 cells. *J Neurosci* 14: 1920-1929

- Jin WQ, Tai KK, Chan TKY, Wong TM (1995) Further characterization of [<sup>3</sup>H]U69593 binding sites in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 27: 1507-1511
- Kieffer B, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG (1992) The delta opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 12048-12052
- Kohn EC, Jacobs W, Kim YS, Alessandro R, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA (1994) Calcium influx modulates expression of matrix metalloproteinase-2. *J Biol Chem* 269: 21505-21511
- Konkoy CS, Childers SR (1989) Dynorphin-selective inhibition of adenylate cyclase in guinea pig cerebellum membranes. *Mol Pharmacol* 36: 627-633
- Krishna G, Weiss B, Brodie BB (1968) A simple, sensitive method for the assay of adenyl cyclase. *J Pharmacol Exp Ther* 163: 379-85
- Krumins SA, Faden AI, Feuerstein G (1985) Opiate binding in rat hearts: Modulation of binding after hemorrhagic shock. *Biochem Biophys Res Commun* 127: 120-128
- Krumins SA (1987) Characterisation of dermorphin binding to membranes of rat brain and heart. *Neuropeptides* 9: 93-102
- Laubie M, Schmitt H, Vincent M, Remond G (1977) Central cardiovascular effects of morphinomimetic peptides in dogs. *Eur J Pharmacol* 46: 67-71
- Lee AY, Wong TM (1987) Effects of dynorphin1-13 on cardiac rhythm and cAMP levels in the isolated perfused rat heart. *Neurosci Lett* 80: 289-92
- Levey AI (1993) Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sci* 52: 441-448

- Li HH, Chung D, Dondeen BA (1976) Isolation, characterisation and opiate activity of  $\beta$ -endorphin from human pituitary glands. *Biochem Biophys Res Com* 72: 1542-1547
- Lord JAH, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW (1977) Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267: 495-499
- Martin R, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE (1976) The effects of morphine and nalorphin-like drugs in the nondependent and morphine dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 197: 517-532
- Mc Closkey DT, Turcato S, Wang GY, Turnbull L, Zhu BQ, Bambino T, Nguyen AP, Lovett DH, Nissenson RA, Karliner JS, Baker AJ (2008) Expression of a  $G_i$ -coupled receptor in the heart causes impaired  $Ca^{2+}$  handling, myofilament injury, and dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H205-H212
- Meunier JC (1995) Isolation and structure of endogenous agonist of opioid receptor-like ORL-1 receptor. *Nature* 377: 532-535
- Millington WR, Evans VR, Battie CN, Bagasara O, Forman LJ (1993) Proopiomelanocortin-derived peptides and mRNA are expressed in rat heart. *Ann N Y Acad Sci* 680: 575-578
- Minami M, Satoh M (1995) Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci Res* 23: 121-145
- Mollereau C (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 341: 33-38
- Mogami H, Lloyd Mills C, Gallagher DV (1997) Phospholipase C inhibitor U73122, releases intracellular  $Ca^{2+}$ , potentiates  $Ins(1,4,5)P_3$ -mediated  $Ca^{2+}$  releases and directly activates ion channels in mouse pancreatic acinar cells. *Biochem J* 324: 645-651

- Muto Y, Nagao T, Urushidani T (1997) The putative phospholipase C inhibitor U73122 and its negative control, U73343, elicit unexpected effects on the rabbit parietal cell. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 1379-1388
- Niroomand F, Mura RA, Piacenti L, Kübler W (1996) Opioid receptor agonists activate pertussis toxin-sensitive G proteins and inhibit adenylyl cyclase in canine cardiac sarcolemma. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 354: 643-649
- Nishizuka Y (1992) Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614
- Pasternak GW (1988) Multiple morphine and enkephalin receptors and the relief of pain. *JAMA* 259: 1362-1367
- Pepe S, Xiao RP, Hohl C, Altschuld R, Lakatta EG (1997) 'Cross talk' between opioid peptide and adrenergic receptor signaling in isolated rat heart. *Circulation* 95: 2122-2129
- Pert CB, Snyder SH (1973) Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. *Science* 179: 1011-1014
- Rasernick MM, Childers SR (1989) Modification of Gs-stimulated adenylyl cyclase in brain membranes by low pH treatment: correlation with altered guanine nucleotide exchange. *J Neurochem* 53: 219-225
- Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati RDATI A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ, Civelli O (1995) Orphanin-FQ: a neuropeptide that activates an opioid-like G protein-coupled receptor. *Science* 270: 792-794
- Salomon Y, Londos C, Rodbell M (1974) A highly sensitive adenylyl cyclase assay. *Anal Biochem* 58: 541-548

- Seamon KB, Padgett W, Daly JW (1981) Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3363-3367
- Sen L, Cui G, Fonarow GC, Laks H (2000) Differences in mechanisms of SR dysfunction in ischemic vs. idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H709-H718
- Sertürner FWA (1805) Säure im Opium. *J Pharmacie Erfurt* 13: 229-243
- Sharma SK, Nirenberg M, Klee WA (1975a) Morphine receptors as regulators of adenylate cyclase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 590-594
- Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M (1975b) Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3092-3096
- Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M (1977) Opiate dependent modulation of adenylate cyclase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3365-3369
- Sheng JZ, Wong NS, Wang HX, Wong TM (1997) Pertussis toxin, but not tyrosin kinase inhibitors, abolishes effects of U-50,488H on  $[Ca^{2+}]_i$  in myocytes. *Am J Physiol* 272: C560-C564
- Simon EJ, Hiller JM, Edelman I (1973) Stereospecific binding of potent narcotic  $[3H]$ -etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 1947-1949
- Simonds WF (1999) G protein regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci* 20: 66-73
- Spampinato S, Canossa M, Ventura C, Bachetti T, Venturini R, Bastagli L, Bernardi P, Ferris S (1991) Heterogeneity of immunoreactive dynorphin B-like material in human, rat, rabbit and guinea-pig heart. *Life Sci* 48: 551-559

- Springhorn JP, Claycomb WC (1992) Translation of heart preproenkephalin mRNA and secretion of enkephalin peptides from cultured cardiac myocytes. *Am J Physiol* 263: H1560-H1566
- Stefano GB (1989) Role of opioid neuropeptides in immunoregulation. *Neurobiol.* 33: 149-159
- Sulakhe PV, Phan NT, Jagadeehs G (1985) Comparison of cholinergic inhibition and beta-adrenergic stimulation of adenylate cyclase from rat and guinea-pig hearts: effects of guanine nucleotides and monovalent cations. *Gen Pharmac* 16: 311-320
- Tai KK, Jin WQ, Chan TKY, Wong TM (1991) Characterization of [<sup>3</sup>H]U69593 binding sites in the heart by receptor binding assays. *J Mol Cell Cardiol* 23: 1297-1302
- Tatsukawa Y, Arita M, Kiyosue T, Mikuriya Y, Nasu M (1993) A comparative study of effects of isoproterenol and dihydroouabain on calcium transients and contraction in cultured rat ventricular cells. *J Mol Cell Cardiol* 25: 707-720
- Terenius L (1973) Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol Toxicol* 32: 317-320
- Teschemacher HJ (1993) Atypical opioid peptides. Herz A (ed.), *Opioids I, Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer-Verlag Berlin, Vol 104: 499-528
- Traber F, Gullis R, Hamprecht B (1975) Influence of opiates on levels of adenosine-3',5'-monophosphate in neuroblastoma x glioma hybrid cells. *Life Sci* 16: 1863-1868
- Ventura C, Muscari C, Spampinato S, Bernardi P, Caldarera CM (1987) Effects of naloxone on the mechanical activity of isolated rat hearts perfused with morphine or opioid peptides. *Peptides* 8: 695-699

- Ventura C, Bastagli L, Bernardi P, Caldarera CM, Guanieri C (1989) Opioid receptors in rat cardiac sarcolemma: effects of phenylephrine and isoproterenol. *Biochem Biophys Acta* 987: 69-74
- Ventura C, Capogrossi MC, Spurgeon HA, Lakatta EG (1991) Kappa-opioid peptide receptor stimulation increases cytosolic pH and myofilament responsiveness to  $\text{Ca}^{2+}$  in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 261: H1671-H1674
- Ventura C, Guarnieri C, Stefanelli C, Cirielli C, Lakatta EG, Capogrossi MC (1991) Comparison between alpha-adrenergic and  $\kappa$ -opioidergic mediated inositol(1,4,5)P<sub>3</sub>/inositol (1,3,4,5) P<sub>4</sub> formation in adult cultured rat ventricular cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 16, 179: 972-978
- Ventura C, Spurgeon H, Lakatta EG, Guarnieri C, Capogrossi MC (1992)  $\kappa$  and  $\delta$  opioid receptor stimulation affects cardiac myocyte function and  $\text{Ca}^{2+}$  release from an intracellular pool in myocytes and neurons. *Circ Res* 70: 66-81
- Wahl-Schott C, Biel M (2009) HCN channels: structure, regulation and physiological function. *Cell Mol Life Sci* 66: 470-494
- Wang JP (1996) U-73122, an aminosteroid phospholipase C inhibitor, may also block  $\text{Ca}^{2+}$  influx through phospholipase C-independent mechanism in neutrophil action. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 353: 599-605
- Wang X, Tresham JJ, Scoggins BA, Coghlan JP (1989) Effects of enkephalins and the analogue FK33824 on mean arterial pressure and heart rate in conscious sheep. *Clin Exp Hypertens [A]* 11/3: 427-445
- Watson JM, Vogel SM, Cotterell DJ, Dubocovich ML (1988) Cholinergic antagonism of  $\beta$ -adrenergic stimulated action potentials and adenylate cyclase activity in rabbit ventricular cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 155: 101-108
- Wei JW, Wang MC (1990) Muscarinic M<sub>2</sub> receptors coupled to inhibition of adenylate cyclase in rat heart. *Chin J Physiol* 33: 315-327



- Wenzlaff H, Stein B, Teschemacher HJ (1998) Diminution of contractile response by kappa-opioid receptor agonists in isolated rat ventricular cardiomyocytes is mediated via a pertussis toxin-sensitive G protein. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 358: 360-366
- White AA, Zenser TV (1971) Separation of cyclic 3',5'-nucleoside monophosphates from other nucleotides on aluminum oxide columns. Application to the assay of adenylyl cyclase and guanylyl cyclase. *Anal Biochem* 41: 372-96
- Xia G, Sheng JZ, Tai KK, Wong TM (1994) Effects of chronic U50,488H treatment on binding and mechanical responses of rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 930-934
- Xiao RP, Spurgeon HA, Capogrossi MC, Lakatta EG (1993) stimulation of opioid receptors on cardiac ventricular myocytes reduces L type  $Ca^{2+}$  channel current. *J Mol Cell Cardiol* 25: 661-666
- Xiao RP, Pepe S, Spurgeon HA, Capogrossi MC, Lakatta EG (1997) Opioid peptide receptor stimulation reverses beta-adrenergic effects in rat heart cells. *Am J Physiol* 272: H797-H805
- Yamada K, Yoshida S, Shimada Y (1991) Atrial natriuretic polypeptide secretion via selective activation of  $\kappa$ -opioid receptor: role of dynorphin. *Am J Physiol* 261: E293-E297
- Yu VC, Richards ML, Sadee W (1986) A human neuroblastoma cell line expresses mu and delta opioid receptor sites. *J Biol Chem* 261: 1065-1070
- Yu VC, Li HX, Wong TM (1998) U50,488H inhibits effects of norepinephrine in rat cardiomyocytes. Cross-talk between kappa-opioid and beta-adrenergic receptors. *J Mol Cell Cardiol* 30: 237-251

- Yu VC, Eiger S, Duan DS, Lamah J, Sadee W (1990) Regulation of cyclic AMP by the mu-opioid receptor in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochem* 55: 1390-1396
- Yukimura T, Unger T, Rascher W, Lang RE, Ganten D (1981) Central peptidergic stimulation in blood pressure control: role of enkephalins in rats. *Clin Sci* 61: 347-350
- Zhang WM, Wong TM (1998) Suppression of cAMP by phosphoinositol/ $\text{Ca}^{2+}$  pathway in the cardiac kappa-opioid receptor. *Am J Physiol* 274: C82-C87
- Zimlichman R, Gefel D, Eliahou H, Matas Z, Rosen B, Gass S, Ela C, Eilam Y, Vogel Z, Barg J (1996) Expression of opioid receptors during heart ontogeny in normotensive and hypertensive rats. *Circulation* 93: 1020-1025

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

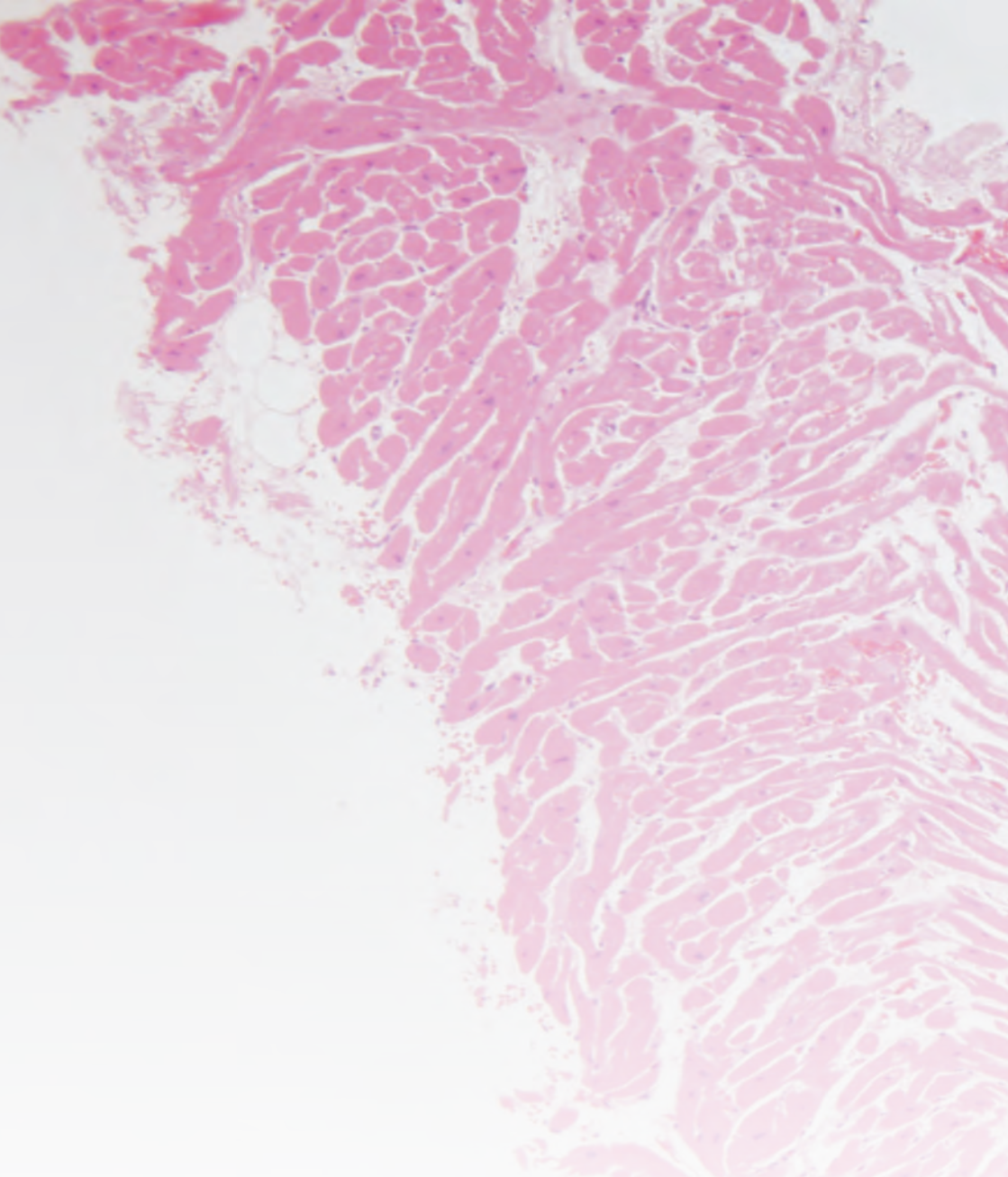
Gießen, Oktober 2009

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Prof. Dr. Hans-Jörg Teschemacher für die Überlassung dieses interessanten Promotionsthemas und seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Ich danke allen Mitglieder der Arbeitsgruppe von Prof. Teschemacher, ganz besonders Dr. Holger Wenzlaff, der mir während seiner Zeit am Rudolf-Buchheim-Institut ein sehr guter Betreuer war. Frau Beate Dickkopf danke ich für ihre Hilfestellungen und praktischen Hinweise bei der Labortätigkeit.

Besonders danken möchte ich Prof. Dr. Florian Dreyer für seine Unterstützung in der schriftlichen Phase der Arbeit. Er hat vom ersten Tag an erinnert, dass die Durchführung der Messungen viel spannender ist als das Zusammenschreiben. Besonders beeindruckt hat mich seine unendliche Geduld und Freundlichkeit.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern, die mir bei meiner Berufswahl und -ausübung immer große Vorbilder waren und die mich immer wieder ermutigt haben, diese Arbeit fertig zu stellen. Besonders danke ich meinem Mann Christian für seine Geduld und Unterstützung. Gut, dass wir uns bei der Laborarbeit getroffen haben.



*édition scientifique*

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5588-2



9 783835 173582